



# Contrôle de AP-1 sur le trafic de E-Cadhérine chez *Drosophila melanogaster*

Nicolas Loyer

## ► To cite this version:

Nicolas Loyer. Contrôle de AP-1 sur le trafic de E-Cadhérine chez *Drosophila melanogaster*. Biologie cellulaire. Université de Rennes, 2014. Français. NNT : 2014REN1S066 . tel-01127334

**HAL Id: tel-01127334**

**<https://theses.hal.science/tel-01127334>**

Submitted on 7 Mar 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : BIOLOGIE*

**Ecole doctorale VAS**

présentée par

**Nicolas Loyer**

Préparée à l'unité de recherche CNRS UMR6290  
Institut de Génétique et Développement de Rennes  
Université de Rennes 1

---

**Contrôle de AP-1  
sur le trafic de  
E-Cadhérine chez  
*Drosophila  
melanogaster***

**Thèse soutenue à Rennes  
le 16 octobre 2014**

devant le jury composé de :

**Grégoire Michaux**

DR CNRS IGDR – *président du jury*

**Antoine GUICHET**

DR CNRS IJM - *rapporteur*

**Pascal THEROND**

DR CNRS IBV - *rapporteur*

**Jean-Paul VINCENT**

Chef d'équipe MRC NIMR - *examineur*

**Roland LE BORGNE**

DR CNRS IGDR - *directeur de thèse*





# Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I Introduction.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1. Rôles du complexe AP-1 dans le trafic membranaire.....</b>                                       | <b>6</b>  |
| 1.1 <u>Structure et composition du complexe</u> .....  | 6         |
| 1.2 <u>Fonction canonique : assemblage du manteau de clathrine et bourgeonnement vésiculaire</u> ..... | 7         |
| <i>Recrutement à la membrane</i> .....   | 8         |
| <i>Reconnaissance du cargo</i> .....   | 8         |
| <i>Recrutement de la clathrine et bourgeonnement</i> .....   | 9         |
| <i>Démantèlement de la vésicule</i> .....  | 10        |
| <i>Transport de la vésicule</i> .....  | 11        |
| <i>Fusion de la vésicule</i> .....   | 11        |
| 1.3 <u>Voies du trafic intracellulaire contrôlées par AP-1</u> .....                                   | 12        |
| <i>Transport bidirectionnel entre le TGN et les endosomes précoces</i> .....                           | 12        |
| <i>Voie biosynthétique et recyclage : adressage à la membrane plasmique</i> .....                      | 16        |
| <i>Transport aux mélanosomes</i> .....   | 17        |
| 1.4 <u>Importance physiologique d'AP-1 in vivo</u> .....   | 20        |
| <i>Organismes unicellulaires</i> .....   | 20        |
| <i>Organismes pluricellulaires</i> .....   | 21        |
| 1.5 <u>Importance d'AP-1 dans les maladies infectieuses</u> .....                                      | 23        |
| 1.6 <u>Fonctions non-canoniques d'AP-1</u> .....   | 24        |
| <b>2. Polarité épithéliale, jonctions d'adhérence et trafic membranaire .....</b>                      | <b>27</b> |
| 2.1 <u>Description de la polarité apico-basale</u> .....   | 27        |
| <i>Complexe PAR</i> .....  | 29        |
| <i>Complexe CRB</i> .....  | 29        |
| <i>Complexe SCRIB</i> .....  | 30        |
| <i>Jonctions serrées/septées</i> .....   | 30        |
| <i>Jonctions d'adhérence</i> .....   | 30        |
| 2.2 <u>Etablissement de la polarité apico-basale</u> .....   | 33        |
| <i>Formation du blastoderme</i> .....  | 33        |
| <i>Formation de l'épithélium folliculaire</i> .....  | 34        |
| 2.3 <u>Tri apico-basal dans l'épithélium</u> .....   | 35        |
| <i>Tri apical</i> .....  | 36        |
| <i>Tri basolatéral</i> .....   | 37        |
| <i>Tri polarisé AP-1 dépendant en dehors des épithélial</i> .....                                      | 40        |
| 2.4 <u>Contrôle du trafic membranaire sur la polarité épithéliale</u> .....                            | 41        |
| <i>Endocytose</i> .....  | 41        |
| <i>Exocytose/recyclage</i> .....   | 42        |
| <i>AP-1 et maintenance de la polarité épithéliale</i> .....  | 43        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.5 <u>Trafic membranaire de E-Cadhérine</u> .....   | 43        |
| <i>Plasticité des jonctions d'adhérence et morphogénèse épithéliale</i> .....  | 43        |
| <i>Endocytose</i> .....  | 44        |
| <i>Exocytose</i> .....   | 45        |
| <b>3. Ovogénèse chez la Drosophile</b> .....   | <b>47</b> |
| 3.1 <u>Ovaire de la Drosophile</u> .....   | 47        |
| 3.2 <u>Déroulement de l'ovogénèse et mouvements morphogénétiques</u> .....   | 48        |
| <i>Assemblage de la chambre d'œuf dans le germarium</i> .....  | 48        |
| <i>Croissance du tissu</i> .....   | 49        |
| <i>Elongation et rotation globale du tissu</i> .....   | 50        |
| <i>Migration postérieure des cellules folliculaires</i> .....  | 51        |
| <i>Migration des cellules de bordure</i> .....   | 51        |
| <i>Migration centripète des cellules folliculaires</i> .....   | 51        |
| 3.3 <u>Ring canals</u> .....   | 52        |
| <i>Cytocinèse incomplète et assemblage du ring canal</i> .....   | 52        |
| <i>Croissance du ring canal</i> .....  | 53        |
| <i>Stabilité des ring canals et trafic transmembranaire</i> .....  | 54        |
| <b>II Objectifs de la thèse et résultats</b> .....   | <b>57</b> |
| <b>1. Objectifs du travail de thèse</b> .....  | <b>57</b> |
| <b>2. Outils et méthodologies</b> .....  | <b>58</b> |
| 2.1 <u>Outils génétiques</u> .....   | 58        |
| 2.2 <u>Microscopie de fluorescence</u> .....   | 60        |
| <b>3. Résultats non inclus dans l'article</b> .....  | <b>62</b> |
| 3.1 <u>Trafic AP1-dépendant d'E-Cad dans le notum</u> .....  | 62        |
| 3.2 <u>AP-1 et maintenance de la polarité de l'épithélium folliculaire</u> .....   | 64        |
| <b>3. Article : un défaut de trafic AP-1-dépendant de E-Cadhérine révèle un rôle de E-Cadhérine dans l'ancrage des ring canals</b> ..... | <b>66</b> |
| 3.1 <u>Résumé en français</u> .....  | 67        |
| 3.2 <u>Résultats et discussion</u> .....   | 69        |
| 3.3 <u>Matériel et méthodes</u> .....  | 79        |
| 3.4 <u>Figures supplémentaires</u> .....   | 83        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>III Discussion.....</b>   | <b>86</b> |
| <b>1. Conclusions du travail de thèse .....</b>                                | <b>87</b> |
| <b>2. Perspectives .....</b>   | <b>89</b> |
| <i>Compensation de E-Cad par N-Cad.....</i>                                    | <i>89</i> |
| <i>Trafic de E-Cad dans le cyste germinale .....</i>                           | <i>90</i> |
| <i>E-Cad et microvillosités.....</i>   | <i>91</i> |
| <i>AP-1 et maintenance de la polarité épithéliale chez la Drosophile .....</i> | <i>92</i> |
| <i>Compensation par GGA .....</i>  | <i>92</i> |
| <i>Hémicomplexes d'APs.....</i>  | <i>93</i> |
| <i>Adaptation cellulaire et trafic membranaire .....</i>                       | <i>97</i> |
| <b>Références bibliographiques.....</b>  | <b>99</b> |

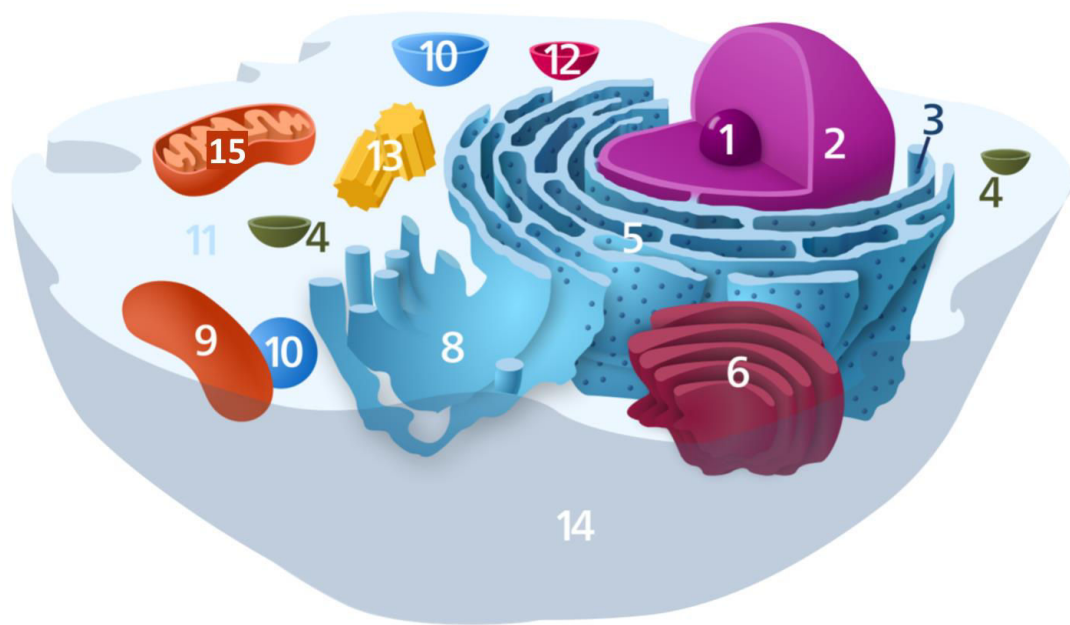
Première partie

# **Introduction**



## Compartimentation cellulaire et trafic vésiculaire

De manière analogue aux tissus animaux compartimentés en organes, l'intérieur des cellules eucaryotes est compartimenté en organites de structures et de fonctions spécialisées.



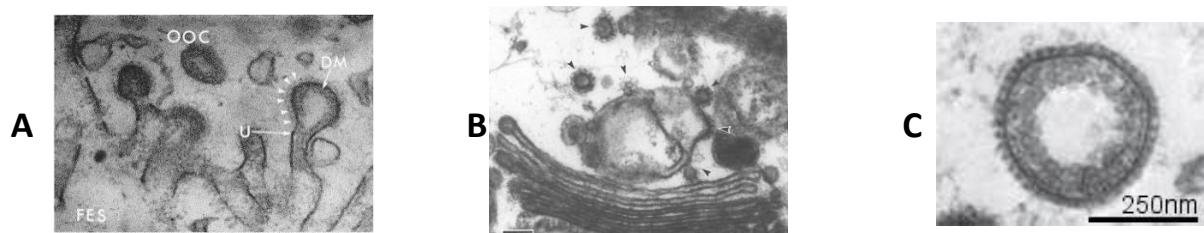
**Figure 1.** Compartiments d'une cellule eucaryote. 1 : nucléole. 2 : noyau. 4 : vésicule. 5 : réticulum endoplasmique. 6 : appareil de Golgi. 8 : réticulum endoplasmique lisse. 9 : Vacuole. 12 : Lysosome. 14 : mitochondrie. 15 : membrane plasmique.

La plupart de ces organites sont séparés du cytosol par au moins une bicouche lipidique et forment avec la membrane plasmique séparant le cytosol du milieu extracellulaire un réseau intracellulaire de membranes. Ces membranes peuvent échanger entre elles de plusieurs façons : en étant directement liées entre elles, en fusionnant entre elles, ou par l'intermédiaire du transport vésiculaire : de petites vésicules membranaires bourgeonnent d'une membrane et fusionnent avec une autre. Cette thèse a pour sujet l'étude du complexe AP-1, un régulateur de certains aspects du transport vésiculaire. Les vésicules, en plus de transporter des lipides, transportent aussi des protéines intégrées (protéines membranaires intégrales aussi appelées transmembranaires) ou temporairement attachées (protéines membranaires périphériques) à la membrane, ainsi que des protéines solubles initialement présentes à l'intérieur du compartiment d'où a bourgeonné la vésicule. La majorité de ces protéines (à l'exception de celles du noyau, des mitochondries et du peroxysome et des protéines membranaires périphériques face cytosolique) sont synthétisées à l'intérieur du réticulum endoplasmique, un organe spécialisé dans la synthèse protéique et lipidique, où elles peuvent aussi être glycosylées (modification post-traductionnelle correspondant à la liaison covalente d'un glucide à une protéine). Si elles ne sont pas retenues au réticulum endoplasmique pour participer à son fonctionnement, elles sont ensuite transportées via des vésicules à l'appareil

de golgi, un organe formé de l'empilement de compartiments distincts appelés cisternes. Les vésicules fusionnent avec la face *cis* du golgi et circulent d'une cisterne à l'autre (par transport vésiculaire et/ou maturation progressive des cisternes) où elles subissent des modifications post-traductionnelles supplémentaires, jusqu'à arriver à la face *trans* du golgi, dite TGN (*Trans Golgi Network*). Du TGN, dont les fonctions de tri seront abordées plus loin, les protéines et lipides peuvent être transportées par des vésicules à la membrane plasmique (il s'agit alors d'exocytose) ou à d'autres organites comme les endosomes ou les lysosomes. Ces vésicules interviennent aussi dans l'endocytose qui permet l'internalisation de protéines membranaires et de matériel extracellulaire : ils bourgeonnent cette fois à partir de la membrane plasmique et circulent jusqu'à un réseau d'endosomes, des organites à partir desquels les protéines internalisées seront soit ré-adressées via le trafic vésiculaire à la surface cellulaire (recyclage), soit au lysosome, un organe où elles seront dégradées. Le trafic vésiculaire, en plus de permettre les échanges intracellulaires nécessaires au fonctionnement interne de la cellule eucaryote, contrôle via l'endocytose et l'exocytose ses interactions avec le milieu extérieur et a donc une importance fondamentale dans une multitude de processus, que ce soient par exemple l'internalisation de nutriments, la sécrétion de ligand et leur reconnaissance par des récepteurs à la surface des cellules, l'adhésion entre cellules via des molécules sécrétées à leur contact ou la transmission synaptique. Des travaux pionniers des laboratoires de J. Rothman, R. Schekman et T. Südhof dans ce domaine ont d'ailleurs été récompensés l'année dernière du prix Nobel de physiologie et de médecine.

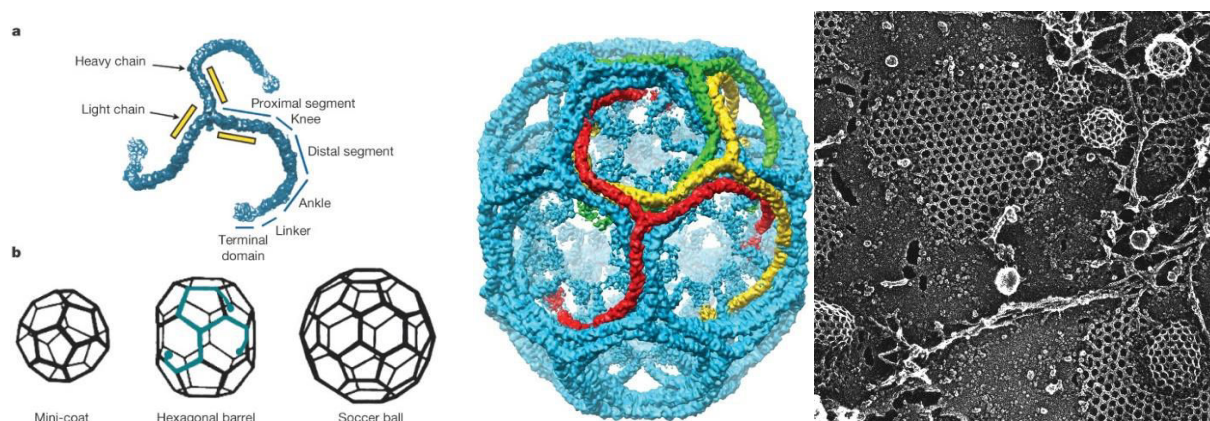
### Manteaux protéiques et complexes adaptateurs

Les vésicules de transport peuvent être recouvertes d'un manteau protéique participant à leur bourgeonnement. Ces manteaux d'une vingtaine de nanomètre d'épaisseur ont été observés pour la première fois bourgeonnant de la membrane plasmique (Roth & Porter 1964) et du TGN (Friend & Farquhar, 1967) par microscopie électronique.



**Figure 2.** (A, B) Premières images de vésicules mantelées bourgeonnant de la membrane plasmique (Roth & Porter 1964) et du TGN (Friend & Farquhar, 1967). (C) Vésicule mantelée à plus haute résolution (Gallop & McMahon, 2005).

Selon leur compartiment d'origine, les vésicules peuvent être couverts (ou non) de manteaux de constitutions protéiques différentes. Les manteaux des vésicules circulant entre le réticulum endoplasmique et le Golgi sont composés des complexes protéiques COPI et COPII, alors que ceux des vésicules bourgeonnant du TGN, des endosomes et de la membrane plasmique, sont constitués de clathrine. L'unité de base du manteau de clathrine est un assemblage de deux protéines (une chaîne légère et une chaîne lourde) en forme de triskèle, qui s'assemblent eux-mêmes en structures hexagonales à la surface du compartiment. Cet assemblage de clathrine joue alors un rôle majeur dans le bourgeonnement vésiculaire (voir page 9).



**Figure 3. (A)** Structure du triskèle de clathrine et reconstitution d'un manteau de clathrine. Adapté de Fotin et al., 2004. **(B)** Image de microscopie à balayage de l'assemblage de clathrine la membrane d'un compartiment donneur et aux vésicules. Adapté de Robinson et al., 1998.

Comment la clathrine est-elle recrutée à des compartiments spécifiques ? L'analyse de vésicules recouvertes de clathrine purifiées a révélé que ces vésicules pouvaient être séparées en deux populations distinctes, contenant chacune un complexe de quatre protéines différentes (Pearse & Robinson, 1984, Keen, 1987). Ces complexes baptisés APs initialement pour Assembly Polypeptides pour leur propriété d'améliorer l'assemblage de la clathrine aux membranes *in vitro* (Keen, 1979), sont aujourd'hui désignés Adaptor Proteins. Ils jouent en effet le rôle d'adaptateur entre la queue cytosolique de protéines transmembranaires et la clathrine. Le complexe AP-1 localise au TGN et aux endosomes (Ahle et al., 1988) et le complexe AP-2 à la membrane plasmique (Robinson, 1987), expliquant la fonction spécifique de la clathrine à ces membranes. Ces découvertes initiales ont posé les bases de trois décennies de recherche sur les complexes APs. Depuis, trois autres complexes APs ont été découverts et impliqués dans différentes voies du trafic intracellulaire (Hirst et al., 2011), mais la grande majorité des travaux se sont concentrés sur AP-1 et P-2.

Dans cette introduction, je commence par couvrir la littérature sur AP-1 depuis sa découverte en 1984 pour dégager une vue la plus synthétique possible de la multitude de fonctions qui lui ont été attribuées dans une multitude de modèles d'études. Une de ces fonctions est le contrôle de la polarité apico-basale des cellules épithéliales, démontré *ex vivo* dans des cellules de mammifères en culture et *in vivo* chez le nématode *Caenorhabditis elegans* et les mammifères. Cela m'amènera à discuter l'implication du trafic membranaire dans l'établissement et le maintien de la polarité apico-basale, et dans la régulation de la molécule d'adhésion E-Cadhérine. Je finirai par introduire le modèle dans lequel j'ai étudié la fonction d'AP-1: le développement de la chambre d'œuf au cours de l'ovogénèse chez *Drosophila melanogaster*.

# Chapitre 1

## Rôles du complexe AP-1 dans le trafic membranaire intracellulaire

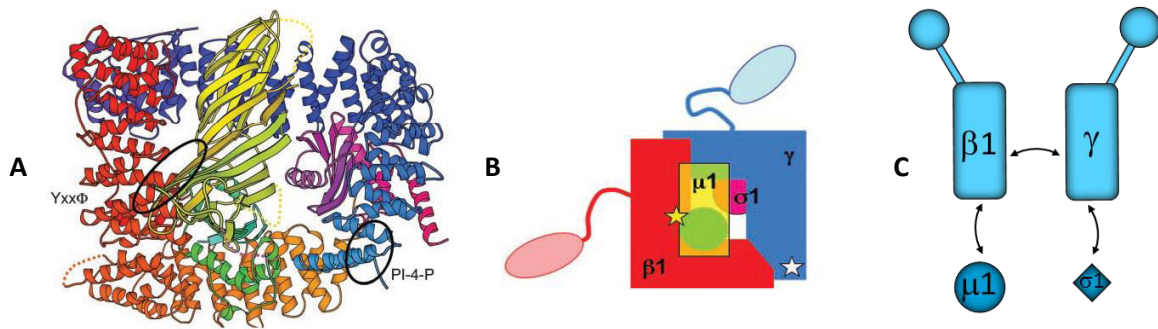
### 1.1 Structure et composition du complexe

Comme tous les APs, AP-1 est composé de quatre sous-unités distinctes (c'est donc un hétérotétramère) : deux grandes sous-unités, appelées  $\beta 1$  et  $\gamma$ , une moyenne,  $\mu 1$ , et une petite,  $\sigma 1$ . Selon les organismes, différents gènes peuvent coder différentes isoformes de certaines sous-unités (Tableau 1), et le même gène peut générer différentes isoformes par épissage alternatif (Mattera et al., 2011). Certaines d'entre elles peuvent être exprimées de façon tissu-spécifiques pour conférer des fonctions spécialisées aux complexes AP-1 qu'elles intègrent : le cas le mieux étudié est celui de l'isoforme  $\mu 1A$  ubiquitaire et de l'isoforme  $\mu 1B$  spécifiquement exprimée dans les épithélia (voir page 38). Malgré l'importante homologie de séquence entre les sous-unités des différents APs, les sous-unités d'un complexe donné ne sont pas incorporées dans d'autres complexes APs, à l'exception des sous-unités  $\beta$  qui sont partagées par AP-1 et AP-2 (mais pas AP-3) chez *D. melanogaster* et *C. elegans*. De manière intéressante, dans des cellules humaines HeLa où AP-1 et AP-2 ont chacun leur propre sous-unité  $\beta$ , en l'absence de  $\beta 2$  la sous-unité  $\beta 1$  de AP-1 est incorporée dans le complexe AP-2 et contribue à sa fonction d'endocytose (Keyel et al., 2008).

|         | Vertébrés                           | <i>D. melanogaster</i> | <i>C. elegans</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. pombe</i> |
|---------|-------------------------------------|------------------------|-------------------|----------------------|-----------------|
| Grandes | $\gamma 1$ $\gamma 2$               | $\gamma$               | $\gamma$          | $\gamma$             | $\gamma$        |
|         | $\beta 1$                           | $\beta 1/2$            | $\beta 1/2$       | $\beta 1$            | $\beta 1$       |
| Moyenne | $\mu 1A$ $\mu 1B$                   | $\mu 1$                | Apm1 Unc-101      | Apm1 Apm2            | $\mu 1$         |
| Petite  | $\sigma 1A$ $\sigma 1B$ $\sigma 1C$ | $\sigma 1$             | $\sigma 1$        | $\sigma 1$           | $\sigma 1$      |

**Tableau 1.** Isoformes des sous-unités d'AP-1 chez les modèles d'étude métazoaires. Les sous-unités  $\beta 1$  de *D. melanogaster* et *C. elegans* sont appelées  $\beta 1/2$  parce qu'elles sont communes aux complexes AP-1 et AP-2 dans ces organismes. Adapté de Boehm & Bonifacino, 2001.

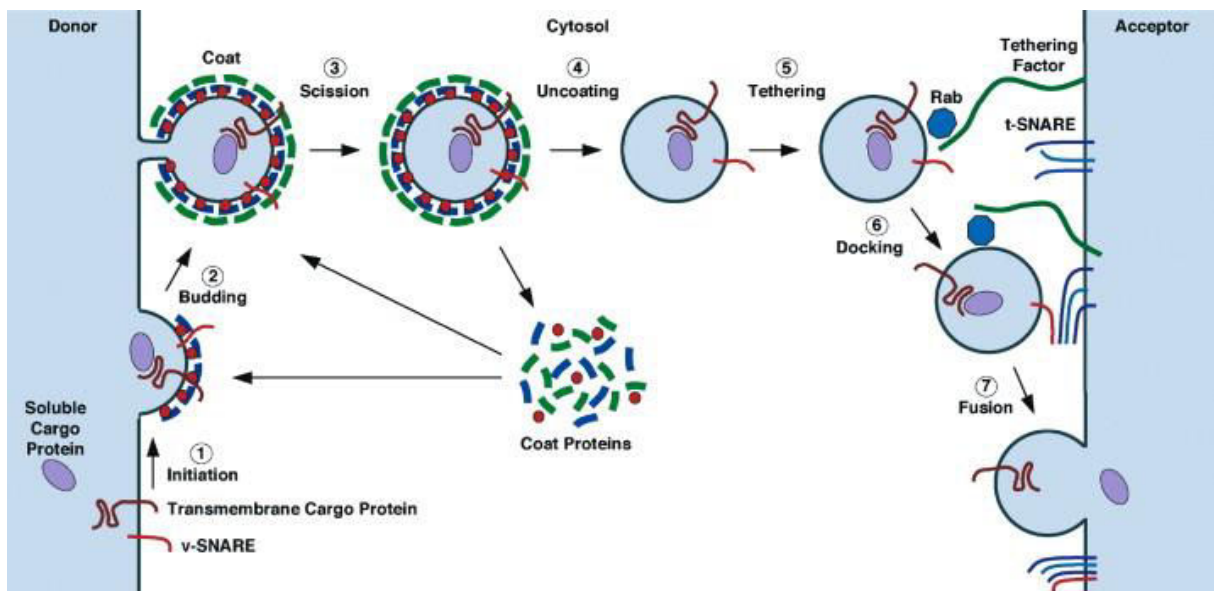
Le complexe entier a pour structure un cœur où interagissent les sous-unités  $\mu 1$  et  $\sigma 1$  et les domaines N-Ter des grandes sous-unités  $\beta 1$  et  $\gamma$  (Page & Robinson, 1995), d'où émergent deux appendices ou « oreilles » reliées au cœur par une tige flexible. La structure du cœur a été déterminée par cristallographie (Heldwein et al., 2004, Figure 4).



**Figure 4. (A, B)** Structure du cœur du complexe AP-1 et dessin interprétatif. La sous-unité  $\beta 1$  est en rouge/orange,  $\gamma$  en bleu,  $\mu 1$  en jaune/vert,  $\sigma 1$  en rose violet. Etoile jaune : site de liaison aux signaux tyrosine. Etoile blanche : site de liaison supposé aux PIPs. Adapté de Heldwein et al., 2004. **(C)** Les interactions physiques entre les sous-unités sont représentées par de flèches.

## 1.2 Fonction canonique : assemblage du manteau de clathrine et bourgeonnement vésiculaire

La fonction canonique d'AP-1 est de jouer le rôle d'adaptateur entre la queue cytosolique de protéines transmembranaires (appelées cargos) et la clathrine au TGN et aux endosomes pour concentrer ces cargos, permettre l'assemblage de la clathrine et ainsi incorporer les cargos dans des vésicules de transport. Cette partie décrit les étapes de ce processus et leur régulation, et l'implication d'AP-1 dans ce processus de la formation de la vésicule au compartiment donneur à sa fusion au compartiment accepteur.



**Figure 5.** Du bourgeonnement d'une vésicule à un compartiment donneur à sa fusion à un compartiment accepteur. Adapté de Bonifacino & Glick, 2004

### *Recrutement d'AP-1 à la membrane.*

Les membranes sont formées d'un assemblage de lipides assemblés en bicouche. Les phosphoinositides (PI) sont une classe de lipides présentant à la surface de cette bicouche un résidu inositol dont des atomes carbone en position 3, 4 et 5 peuvent être phosphorylés par diverses kinases. Ainsi, différentes combinaisons de phosphorylations génèrent différentes classes de PI mono-, bi- ou triphosphate, qui contribuent à conférer à différents compartiments leurs identités et propriétés en recrutant spécifiquement certaines protéines. Ainsi, le TGN est par exemple enrichi en PI(4)P, les endosomes précoces en PI(3)P, les endosomes tardifs en PI(3,5)P<sub>2</sub> et la membrane plasmique en PI(4,5)P<sub>2</sub> (Gokhale, 2013 pour revue). Le recrutement d'AP-1 à la membrane du TGN ou des endosomes est contrôlé par sa préférence pour le PI(4)P (Heldwein et al., 2004, Wang et al., 2003) conférée par sa sous-unité  $\gamma$  (de la même manière, le recrutement d'AP-2 à la membrane plasmique dépend de sa préférence pour les PI(4,5)P<sub>2</sub> conférée par  $\alpha$ , Gaidarov & Keen, 1999). Le recrutement est aussi strictement dépendant de son interaction physique via ses sous-unités  $\beta$ 1 et  $\gamma$  avec la petite GTPase Arf1 (Stamnes & Rothman, 1993, Traub et al., 1993), elle-même régulée par des GEFs (Guanine Exchange Factors) et des GAP (GTPase activating protein) le faisant cycliser entre une forme active liée au GTP capable de s'associer aux membranes, et une forme inactive cytosolique liée au GDP (Donaldson and Jackson, 2011). En plus de recruter AP-1, Arf1 l'active en le fait passer d'une conformation « fermée » à une conformation « ouverte », plus à même d'interagir avec les queues cytosoliques de ses cargos (Ren et al., 2013). Le recrutement d'AP-1 à la membrane s'accompagne aussi de la phosphorylation de  $\mu$ 1, qui augmente son affinité pour les signaux de tri, et de la déphosphorylation de  $\beta$ 1 par la phosphatase PP2A, qui augmente son affinité pour la clathrine (Ghosh & Kornfeld, 2003). Enfin, le recrutement d'AP-1 aux membranes nécessite la protéine Laa1/Sip1/p200 aussi bien chez les levures (Fernandez & Payne, 2006 ; Yu et al., 2012) que chez *D. melanogaster* (Le Bras et al., 2012), une protéine conservée chez les mammifères (Hirst et al., 2005).

### *Reconnaissance du cargo.*

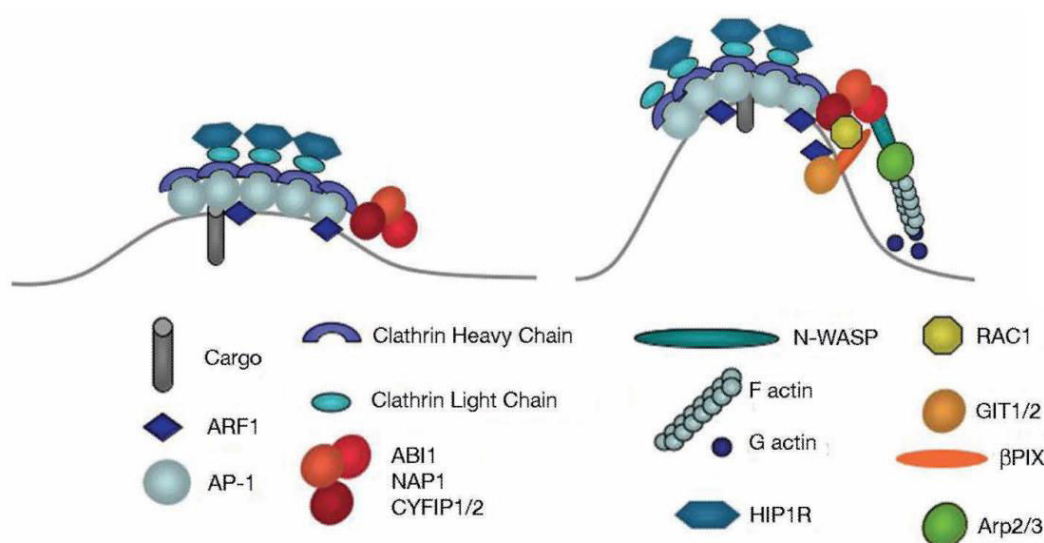
Une fois recruté à la membrane par Arf1 et PI(4)P, AP-1 peut se lier de manière stable à des signaux de tri portés par la queue cytosolique de ses cargos. La reconnaissance du signal de tri stabilise l'interaction Arf1/AP-1, qui n'est autrement que transitoire, et permet l'oligomérisation d'AP-1 (Le Borgne et al., 1996, Meyer et al., 2005, Lee et al., 2008a) permettant de concentrer les cargos reconnus au même sous-domaine membranaire. Les signaux de tri reconnus par les complexes APs sont de courtes séquences d'acides aminés, les



plus répandues et les mieux caractérisées (au moins pour AP-1, 2 et 3) étant le signal Tyrosine (YXXØ où Ø est un acide aminé hydrophobe et X des acides aminés variables) reconnu par leurs sous-unités  $\mu$  (Ohno et al., 1995, Owen & Evans, 1998) et le signal di-Leucine ([DE]XXXL[LI]) reconnu par une combinaison de leurs sous-unités  $\gamma/\sigma 1$ ,  $\alpha/\sigma 2$  et  $\delta/\sigma 3$  (Janvier et al., 2003, Doray et al., 2007). Un de ces signaux de tri peut être reconnu par un ou plusieurs complexe AP : cette spécificité est modulée par les acides aminés variables et ceux environnant les séquences consensus (Ohno et al., 1998 ; Doray et al., 2007 ; Mattera et al., 2011), ainsi que par la nature des isoformes incorporées dans les complexes APs (Mattera et al., 2011 ; Guo et al., 2013a). Quelques cas de signaux non canoniques permettant une interaction directe avec AP-1 ont été décrits, tels que la séquence MSASTHSHKRKN de Ste13p chez *S. cerevisiae* (Foote et al., 2006), la séquence GDNS de Tfr (Gravotta et al., 2012) et des signaux à base de Tyrosine et de groupements acides de LDLR (Guo et al., 2013a) chez les mammifères.

#### *Recrutement de la clathrine et bourgeonnement.*

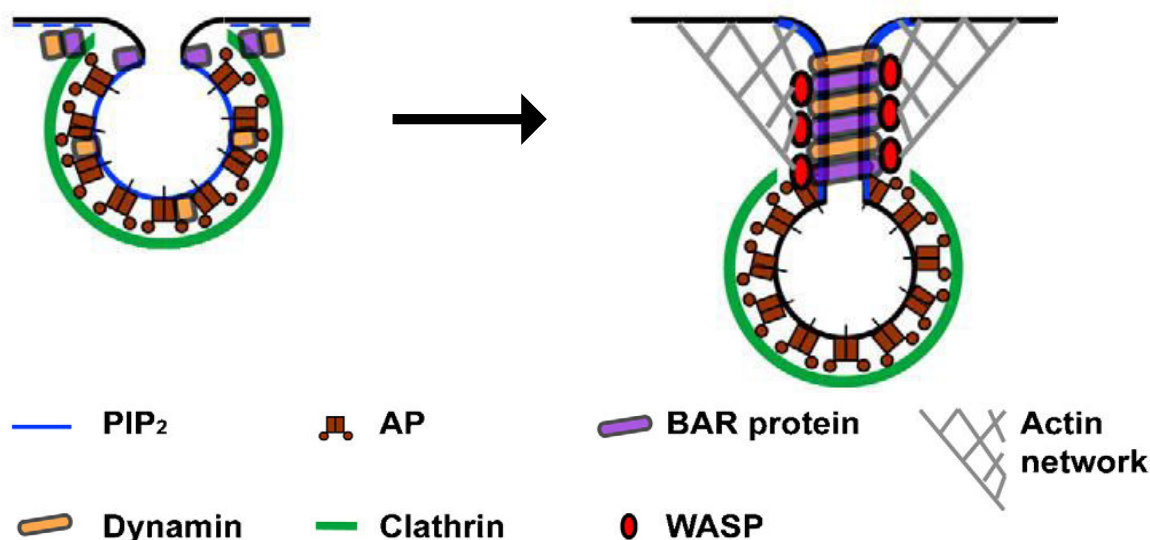
L'oligomérisation des complexes AP-1 permet le recrutement de la clathrine par leurs sous-unités  $\beta$  (Gallusser & Kirchhausen, 1993 ; Knuehl et al., 2006). La clathrine recrute un réseau de protéines contrôlant la polymérisation de l'actine. Arf1 intervient à nouveau, cette fois en recrutant la GEF  $\beta$ -PIX qui active la petite GTPase Rac1, qui active à son tour la polymérisation de l'actine par les complexes recrutés par la clathrine (Anitei et al., 2010).



**Figure 6.** Recrutement et activation de polymérisateurs de l'actine par la clathrine et Arf1. Adapté de Anitei et al., 2010.



En plus de recruter des régulateurs de l'actine, la clathrine polymérise en une structure courbée, induisant une courbure de la membrane elle-même (voir McMahon & Gallop, 2013 pour revue). La courbure de la membrane initiée par la clathrine et renforcée par la polymérisation de l'actine vers la membrane (Anitei et al., 2010) peut être détectée par certaines protéines à l'aide de leur domaine BAR comme la Cortactine, qui soutiennent la polymérisation de l'actine, renforcent la courbure de la membrane et finalement coopèrent avec la dynamine, une GTPase nécessaire pour la fission membranaire libérant la vésicule de la membrane. Arf1 a aussi la propriété de recruter la kinase PtdIns-4-OH kinase-beta, et pourrait ainsi localement stimuler la production de PI(4,5)P<sub>2</sub> à ces membranes normalement enrichies en Pls monophosphate (Godi et al., 1999). Les PI(4,5)P<sub>2</sub> générés par PtdIns-4-OH kinase-beta pourraient intervenir dans la fission en déstabilisant la membrane (voir Ramachandran, 2011 pour revue).

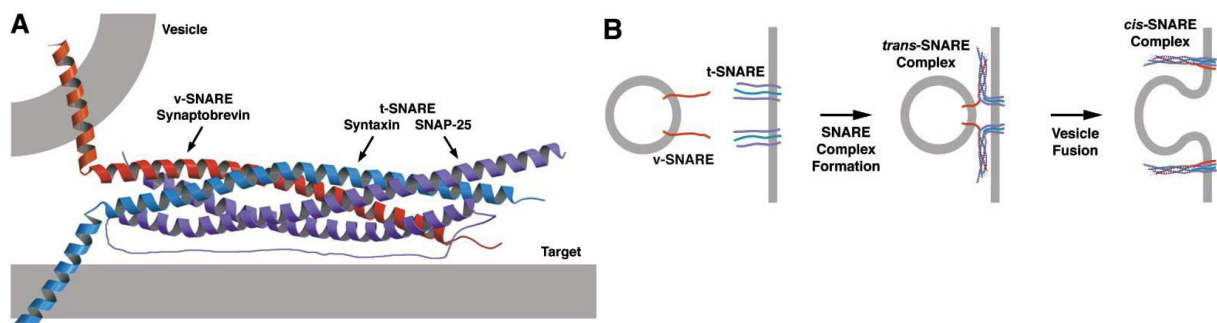


**Figure 7.** Fission vésiculaire médiée par la Dynamine (voir texte plus haut). Adapté de Ramachandran, 2011.

*Démantèlement de la vésicule.* Après la fission, le manteau protéique doit être désassemblé pour recycler ses composants, qui pourront à nouveau intervenir dans le bourgeonnement vésiculaire, et pour permettre la fusion de la vésicule à son compartiment de destination. La clathrine est désassemblée par l'ATPase Hsc70 (Heat shock cognate protein 70), elle-même recrutée par l'Auxilline (Ungewickell et al., 1995). Hsc70 intervient aussi dans le désassemblage d'AP-1 en recrutant et en coopérant avec la phosphatase PP2A (protein phosphatase 2A) qui déphosphoryle la sous-unité  $\mu$ 1 (Ghosh & Kornfeld, 2003). La déphosphorylation de la sous-unité  $\mu$ 1 permet aussi le recyclage du complexe lié au TGN (Medigeschi et al., 2007) en permettant son interaction avec la protéine cytosolique PREPL (prolyl-oligopeptidase-like protein) (Radhakrishnan et al., 2013).

*Transport de la vésicule.* Les vésicules sont transportées du compartiment donneur au compartiment accepteur à l'aide de moteurs moléculaires leur permettant un mouvement unidirectionnel le long des cytosquelettes d'actine et de microtubules. Ces moteurs se fixent aux vésicules en interagissant directement avec leurs lipides, avec leurs cargos, ou via des adaptateurs moléculaires (Soldati & Schliwa, 2006 pour revue). AP-1 peut jouer ce rôle d'adaptateur : en cellules de mammifères, la sous-unité  $\beta 1$  interagit directement avec la kinésine Kif13A (Nakagawa et al., 2000 ; Delevoye et al., 2009) ; la sous-unité  $\gamma$  interagit via la protéine membranaire périphérique Gadkin avec la kinésine KIF5C (Schmidt et al., 2009 ; Maritzen et al., 2010), et la perte de ces interactions induit un défaut de transport de vésicules dérivés du TGN et/ou des endosomes.

*Fusion de la vésicule.* La dernière étape du transport vésiculaire est contrôlée par des SNAREs, des protéines transmembranaires présentes sur les vésicules (v-SNAREs) et sur les membranes des compartiments cibles (t-SNAREs). Ces SNAREs s'associent entre elles et forment un complexe *trans*-SNARE comprenant quatre hélices supposé apporter l'énergie nécessaire à la fusion membranaire (voir Bonifacino & Glick, 2004 pour revue). En plus de permettre la fusion elle-même, Les SNAREs contribuent à sa spécificité : des v-SNAREs spécifiques n'interagissent qu'avec des t-SNAREs spécifiques (McNew et al., 2000). Selon le compartiment cible, cette spécificité requiert des facteurs supplémentaires, tels que le complexe exocyste participant à l'ancrage de la vésicule à la membrane plasmique avant sa fusion (Guo et al., 1999). AP-1 peut intervenir dans la régulation de l'ancrage et/ou la fusion en recrutant l'exocyste (voir page 16), ou en incorporant certaines SNAREs dans les vésicules (Peden et al., 2001) et peut-être même directement à l'ancrage pendant le transport rétrograde (voir *Fonctions non-canoniques* page 24).



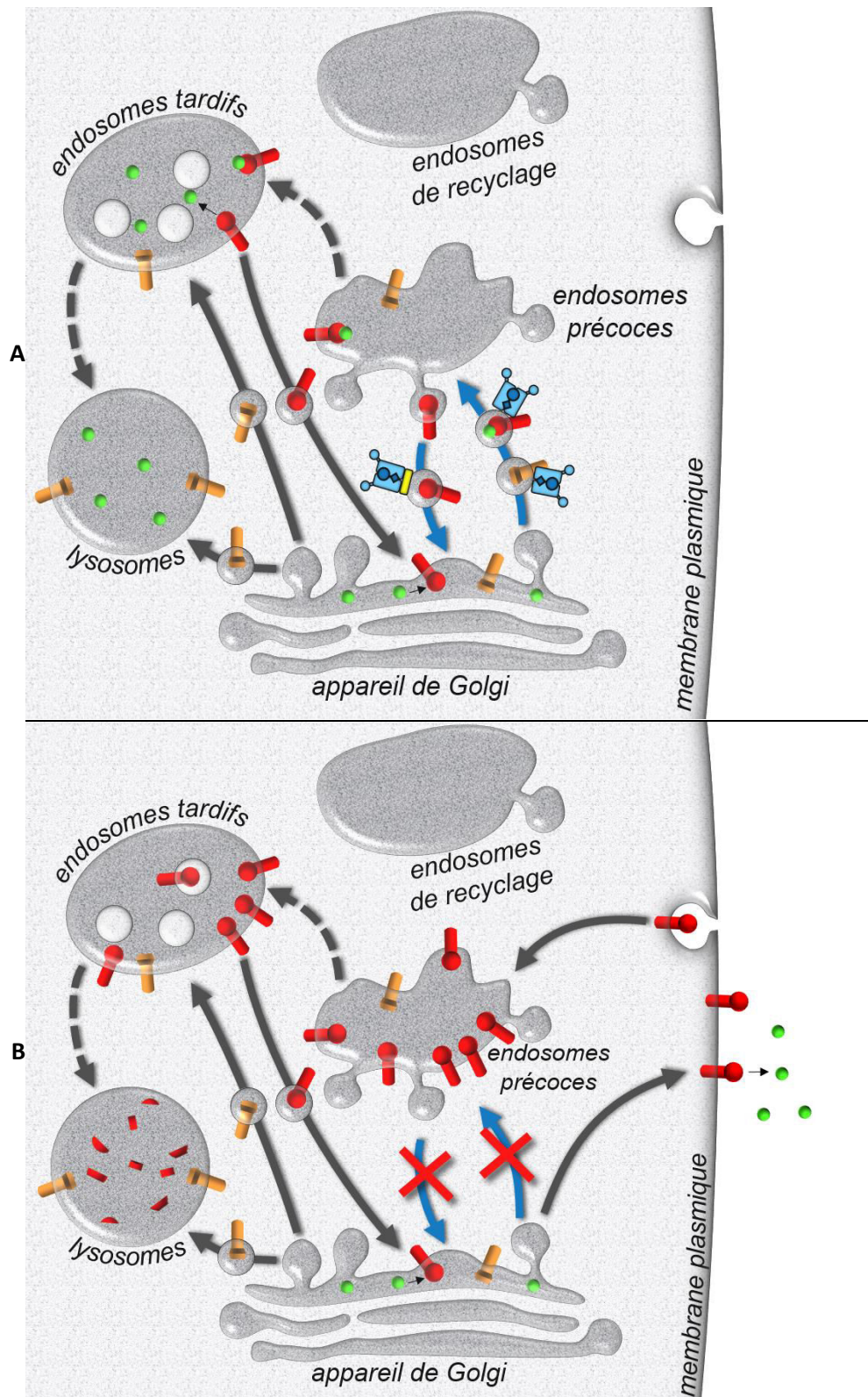
**Figure 8.** SNAREs et fusion vésiculaire. **(A)** Complexe *trans*-SNARE entre une v-SNARE (rouge) et trois t-SNAREs (bleu et violet) **(B)** Etapes de la fusion vésiculaire. Adapté de Bonifacino & Glick, 2004.

### 1.3 Voies du trafic vésiculaire contrôlées par AP-1

*Localisation du complexe AP-1.* L'ensemble de la littérature s'accorde sur ce point : AP-1 localise au TGN et «aux endosomes». C'est sur la nature exacte de ces endosomes que les résultats peuvent diverger : selon les articles et selon les marqueurs d'endosomes utilisés, AP-1 localise aux endosomes de recyclage (Shiba et al., 2002 ; Fölsch et al., 2003 ; Gravotta 2012) et/ou aux endosomes précoces. (Le Borgne et al., 1993 ; Proikas-Cezanne et al., 2006 ; Guo et al., 2013a). AP-1 ayant des fonctions établies dans le transport à partir de chacun de ces compartiments, il localise vraisemblablement à chacun d'entre eux, et des localisations variables à un compartiment d'un type cellulaire à l'autre pourraient peut-être refléter des abondances variables de ces cargos selon ces types cellulaires, ou bien la localisation spécifique d'AP-1 à certains sous-ensembles d'endosomes précoces et certains sous-ensembles d'endosomes de recyclage. AP-1 ne localise en tout cas pas aux endosomes tardifs (le seul complexe AP localisant aux endosomes tardifs est AP-5, dont la fonction exacte est encore inconnue, Hirst et al., 2011).

*Transport bidirectionnel entre le TGN et endosomes précoces.*

Les récepteurs du mannose-6-phosphate (MPRs) sont parmi les cargos d'AP-1 les plus étudiés. Ces récepteurs fixent des hydrolases lysosomales solubles portant des résidus mannose-6-phosphate dans la lumière du TGN et les transportent du TGN aux endosomes précoces. Pendant la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs, la diminution de leur pH induit un décrochage des hydrolases, qui restent dans l'endosome tardif jusqu'à sa maturation en lysosome, alors que les MPRs sont recyclés des endosomes précoces et/ou tardifs au TGN (transport rétrograde) où ils peuvent à nouveau prendre en charge des hydrolases.



**Figure 9. AP-1 dans le trafic lysosomal. (A)** Des récepteurs (rouge) d'enzymes lysosomales soluble, par exemple les MPRs (mammifères), LERP (*D. melanogaster*) ou Vps10 (*S. cerevisiae*) fixent ces enzymes (vert, e.g. CPY chez *S. cerevisiae*) dans la lumière du TGN et sont adressés aux endosomes précoces par AP-1 et GGA, ainsi que certaines protéines transmembranaires lysosomales (orange). Les endosomes précoces mûrissent (flèches en pointillés) en endosomes tardifs où les récepteurs relâchent les enzymes. Les récepteurs mais pas les protéines lysosomales peuvent être réadressées des endosomes précoces au TGN par AP-1 en coopération avec CLASP-1 (barre jaune) et des endosomes tardifs au TGN dans une voie AP-1-indépendante. Les protéines transmembranaires lysosomales peuvent être directement adressées aux endosomes tardifs ou aux lysosomes via d'autres voies. **(B)** En l'absence d'AP-1, certaines enzymes lysosomales et leurs récepteurs peuvent être adressés à la membrane plasmique plutôt qu'aux endosomes précoces. Les enzymes sont donc sécrétées dans le milieu extracellulaire et les récepteurs atteignent finalement les endosomes précoces où il s'accumulent en raison d'un problème de transport rétrograde (voir texte).

La perte de fonction d'AP1 induit l'accumulation de MPRs aux endosomes précoces et le ralentissement du retour au TGN (Meyer et al., 2000), indiquant qu'AP-1 est nécessaire à leur transport rétrograde (voir plus loin). Les MPRs peuvent être sécrétés du TGN à la membrane plasmique avec leurs enzymes (qui sont donc relâchées dans le milieu extracellulaire) en l'absence d'AP-1, puis être internalisés et rejoindre les endosomes précoces. Le fait que les MPRs soient capables de sortir du TGN en l'absence d'AP-1 suggérerait également que, malgré sa localisation au TGN, AP-1 n'intervient pas dans le transport antérograde du TGN aux endosomes. Il a cependant été montré que d'autres protéines adaptatrices de la clathrine, les GGAs (Golgi-localised,  $\gamma$ -ear-containing, ARF-binding proteins), fonctionnent de manière partiellement redondante avec AP-1 dans le transport antérograde. En effet, les MPRs (et leur homologue Lerp (lysosomal enzyme receptor protein) chez *D. melanogaster*) ne sont bloqués au TGN qu'en condition de perte de fonction simultanée de AP-1 et de GGA dans des cellules de Drosophile et de mammifères en culture (Hirst et al., 2009, Kametaka et al., 2010). Les GGAs sont des protéines adaptatrices monomériques contenant un domaine C-Terminal très homologue à l'oreille de la sous-unité  $\gamma$  de AP-1 et localisant comme AP-1 au TGN (mais pas aux endosomes) de manière Arf1-dépendante. Elles existent en deux exemplaires chez *S. cerevisiae*, trois exemplaires chez les mammifères et un seul exemplaire chez *D. melanogaster*. Bien qu'ils soient partiellement redondants entre eux (et soient donc capables de générer individuellement leurs propres vésicules), AP-1 et GGA peuvent au moins chez les mammifères aussi fonctionner de manière coopérative : les GGAs concentrent leurs cargos aux membranes du TGN, puis interagissent directement avec la sous-unité  $\gamma$  d'AP-1, qui recrute la kinase CK2 phosphorylant GGA1 et 3 et induisant ainsi leur détachement (Doray et al., 2002). GGA2 n'est pas sujet à cette régulation et peut donc être incorporée avec AP-1 dans des vésicules (Hirst et al., 2012).

Le transport rétrograde, en plus de permettre à des protéines comme les MPRs de cycler entre le TGN et les endosomes pour transporter des hydrolases, est aussi nécessaire pour maintenir la localisation de protéines résidentes du TGN. C'est le cas de la Furine, une protéase transmembranaire impliquée dans la maturation protéolytique au TGN. Le rôle d'AP-1 dans le transport rétrograde de ces deux cargos nécessite la protéine PACS-1 (phosphofurin acidic cluster sorting protein-1). PACS-1 joue le rôle d'adaptateur entre AP-1 et ces cargos en interagissant physiquement à la fois avec AP-1 et des signaux de tri à base de clusters acides sur leur queue cytoplasmique (Crump et al., 2001). La protéine GCC185 (Golgi coiled-coil protein 185) sert à la fois d'échafaudage pour maintenir la structure du TGN et de site de

liaison aux vésicules retournant au TGN par transport rétrograde. AP-1 est capable d'interagir physiquement avec un de ces domaines permettant l'ancrage des vésicules, suggérant un rôle supplémentaire d'AP-1 dans le transport rétrograde une fois que les vésicules ont atteint de TGN (voir pages 14 et 24, Brown et al., 2011). Enfin, le transport rétrograde est aussi contrôlé par le complexe protéique rétromère, agissant indépendamment d'AP-1 et sur des compartiments différents (Seaman et al., 2007), possiblement aux endosomes tardifs où AP-1 ne localise pas.

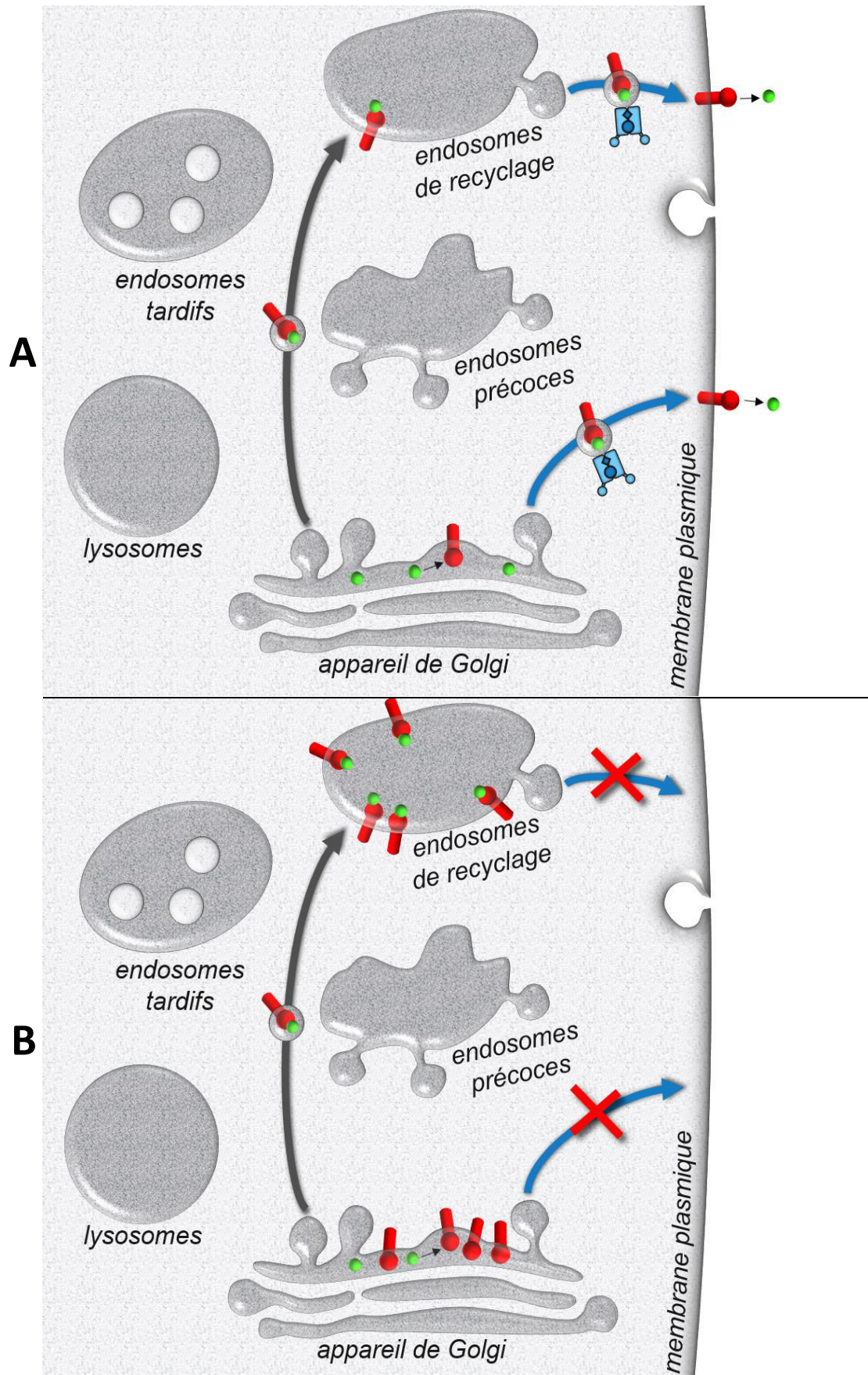
La technique Knocksideways (nommée en référence aux techniques de délétion de gènes, Knockout, et d'inhibition de la traduction, Knockdown) est un outil génétique permettant d'inactiver la fonction d'une protéine en la séquestrant à un compartiment donné. Ce système repose sur l'induction de l'interaction entre la protéine à inhiber et une protéine « piège », résidant à ce compartiment. Un avantage du Knocksideways est d'inactiver extrêmement rapidement (10 minutes) la fonction de la protéine ciblée par rapport à une technique de Knockdown par RNAi (de un à plusieurs jours, Robinson et al., 2010). La rapidité de cette inhibition a deux avantages : elle permet d'observer les conséquences directes de l'inactivation d'un gène, et elle ne laisse pas le temps aux cellules de mettre en place d'éventuels systèmes compensatoires. Cette technique a été utilisée pour la première fois sur AP-1 et AP-2 en cellules humaines HeLa. Le Knocksideways d'AP-2 donne des résultats très similaires à son Knockdown, mais substantiellement différents pour AP-1. L'accumulation de MPRs aux endosomes précoces est immédiate, confirmant un rôle direct d'AP-1 dans le transport rétrograde, et plus importante qu'avec le Knockdown, suggérant une adaptation des cellules en cas de déplétion lente (Robinson et al., 2010). Cette technique a été utilisée pour comparer les contributions respectives de GGA2 (mais pas de GGA1 et 3) et d'AP-1 dans le transport bidirectionnel entre le TGN et les endosomes : il en ressort qu'AP-1 participe aussi bien au transport antérograde qu'au transport rétrograde d'une trentaine de protéines transmembranaires et d'une trentaine de protéines membranaires périphériques, alors que GGA2 est uniquement impliquée dans le transport antérograde d'hydrolases. Il apparaît aussi que GGA2 n'est plus incorporée en compagnie d'AP-1 dans les vésicules recouvertes de clathrine dans le Knocksideways d'AP-1 (la réciproque n'étant pas vraie), indiquant une coopération entre AP-1 et GGA2, mais est incorporée aux vésicules dans le Knockdown d'AP-1, suggérant que la cellule a dans ce cas eu le temps de mettre en place un système de compensation faisant intervenir au moins GGA2 (Hirst et al., 2012).



Chez *S. cerevisiae*, les modèles d'étude du transport bidirectionnel entre le TGN et les endosomes sont la maturation du facteur  $\alpha$ , dépendante de l'adressage correct de l'enzyme lysosomale Kex2, et le trafic de l'enzyme lysosomale soluble CPY et son récepteur Vps10, qui est comme les MPRs recyclé des endosomes au TGN par transport rétrograde. Comme chez les mammifères, les deux GGAs de levure et AP-1 ont des fonctions partiellement redondantes dans le transport antérograde : la maturation du facteur  $\alpha$  et le trafic de CPY des mutants GGA sont exacerbés par la perte de fonction d'AP-1 (Costaguta et al., 2001, Hirst et al., 2001). AP-1 et GGA pourraient intervenir dans deux voies différentes du transport antérograde : du TGN aux endosomes précoces pour AP-1, et du TGN aux endosomes tardifs pour les GGAs (Phelan et al., 2006 ; Abazeed et al., 2008). Le rôle d'AP-1 (et l'absence de rôle des GGAs) dans le transport rétrograde est aussi conservé (Valdivia et al., 2002 ; Foote & Nothwehr, 2006).

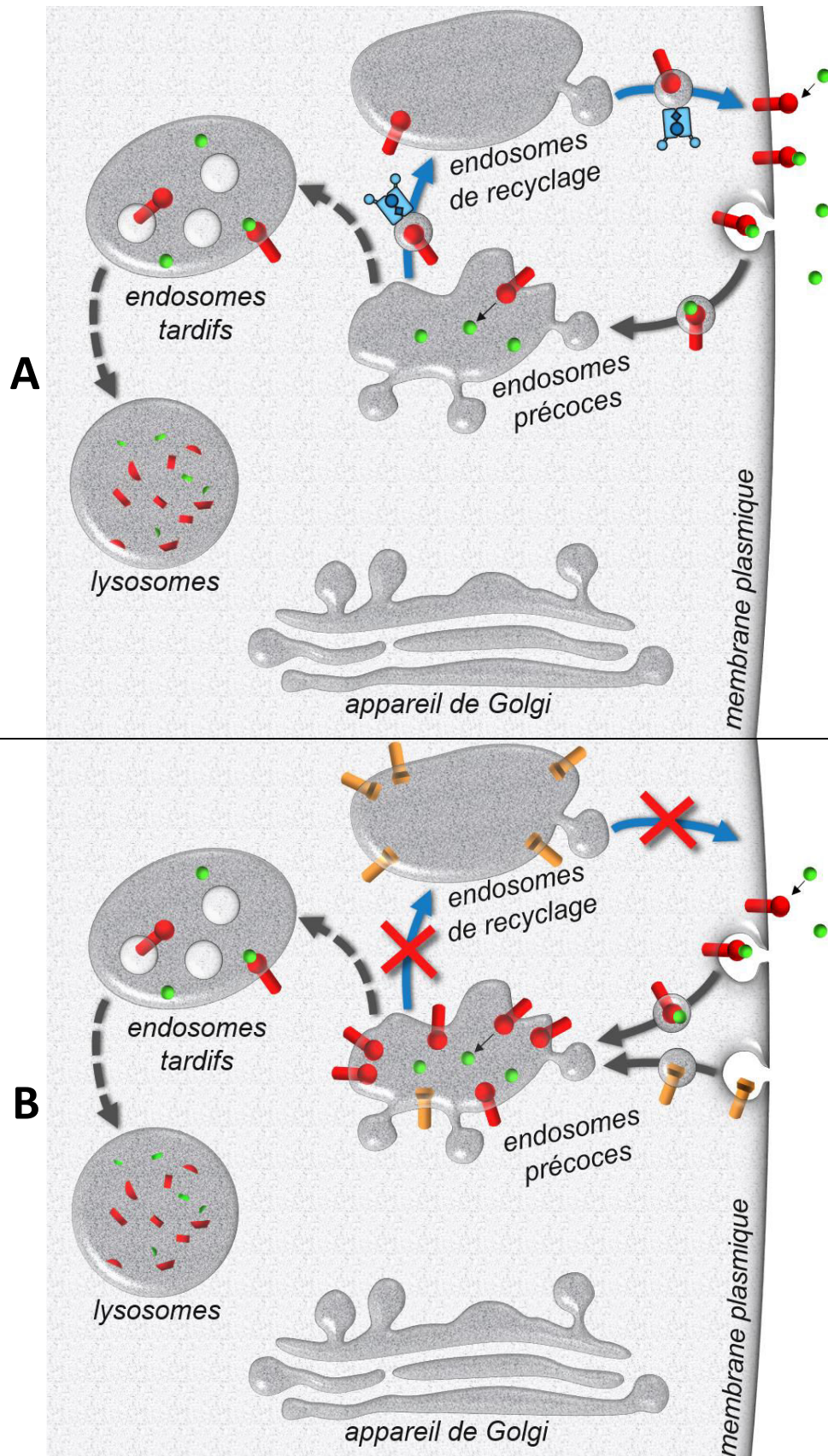
*Voie biosynthétique et recyclage : adressage à la membrane plasmique.*

AP-1 contrôle aussi le transport de protéines sécrétées à la membrane plasmique. Les cargos à destination de la membrane plasmique peuvent soit y être directement adressés à partir du TGN dans la voie biosynthétique, soit transiter par les endosomes de recyclage aussi bien dans la voie biosynthétique (dans une voie contrôlée par Rab13 : Nokes et al., 2008) que dans une voie de recyclage post-endocytaire (voir page 35). Dans les cellules polarisées, AP-1 exerce au TGN et aux endosomes de recyclage une fonction de tri de cargos pour les adresser à un domaine correct de la membrane plasmique. Cette fonction sera abordée plus loin (page 37). Au-delà d'une fonction de tri d'AP-1, le fait que certains cargos au lieu d'être transportés de manière aléatoire en l'absence d'AP-1 soient plutôt bloqués au TGN (e.g. VSVG, Chi et al., 2008 ; Vangl2, Guo et al., 2013b) ou aux endosomes de recyclage (e.g. H1, Pagano et al., 2004 ; Mucine 1, Kinlough et al., 2006 ; E-Cadhérine, Ling et al., 2007) indique que AP-1 est nécessaire pour leur exocytose. Ce rôle passe vraisemblablement (au moins aux endosomes de recyclage) par le recrutement de certaines sous-unités de l'exocyste, un complexe protéique intervenant dans l'exocytose (voir Heider & Munsen, 2012 pour revue) interagissant avec Rab8 pour l'exocytose du TGN à la membrane plasmique (Huler et al., 1993) et avec Rab11 pour l'exocytose des endosomes de recyclage à la membrane plasmique (Zhang et al., 2004). Enfin, il a récemment été montré en cellules HeLa que AP-1 interagit physiquement et coopère avec Rab4 pour le transport des endosomes précoces aux endosome de recyclage dans le trafic post-endocytaire du récepteur de la transferrine (Perrin et al., 2013) .



**Figure 10. AP-1 dans la voie biosynthétique.** (A) Des protéines transmembranaires (en rouge) nouvellement synthétisées fixant éventuellement des protéines solubles au TGN (en vert) sont transportées directement du TGN à la membrane plasmique par AP-1 (e.g. Vangl2), ou transitent par les endosomes de recyclage avant d'être transportées à la membrane plasmique par AP-1 (e.g. E-Cadhérine), voir texte. (B) En l'absence d'AP-1, certaines protéines s'accumulent à l'appareil de Golgi et/ou aux endosomes de recyclage (voir texte). Certaines protéines peuvent aussi être adressées par erreur au trafic lysosomal (non représenté, e.g. Notch, voir page 22).

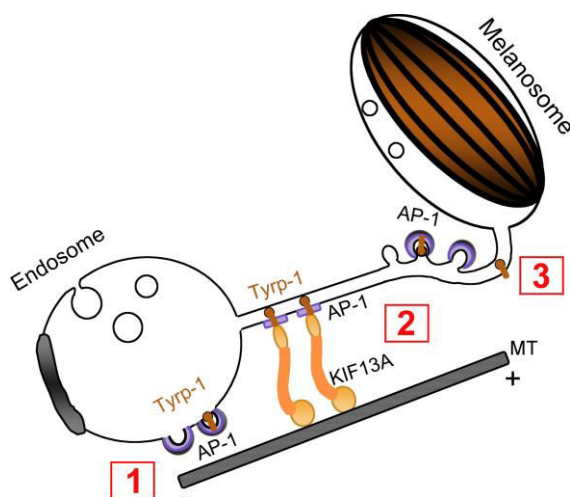




**Figure 11. AP-1 dans les voies post-endocytiques.** Des protéines transmembranaires (en rouge) à la surface de la cellule fixant éventuellement un ligand extracellulaire (en vert) sont internalisées et atteignent les endosomes précoces. Elles peuvent alors être adressées aux endosomes de recyclage par et ensuite atteindre la membrane plasmique (AP-1 peut intervenir dans l'entrée et/ou la sortie des endosomes de recyclage). Alternativement, elles peuvent rester aux endosomes précoces qui mûrissent (flèches en pointillés) en endosomes tardifs puis en lysosomes, où elles sont dégradées. **(B)** En l'absence d'AP-1, les protéines internalisées peuvent s'accumuler aux endosomes précoces (e.g. TfR en cellule HeLa, voir page 16) ou aux endosomes de recyclage.

### Transport aux mélanosomes

Certaines cellules spécialisées génèrent des organites spécialisés pour accomplir leur fonction. C'est le cas des mélanocytes, dans lesquels les endosomes tardifs, au lieu de maturer uniquement en lysosomes, maturent aussi en mélanosomes (qui sont donc appelés organites apparentés aux lysosomes) accumulant le pigment mélanine et des fibres protéiques de type amyloïde impliquées dans la rétention de mélanine. Cette maturation dépend du transport de protéines transmembranaires spécifiques : pmel17, le précurseur des fibres du mélanosome, et les enzymes Tyrp1, Tyrp2 et Tyrosinase, impliquées dans la synthèse du pigment mélanine. AP-1 et AP-3 ont des fonctions partiellement redondantes dans le transport de la Tyrosinase et de Tyrp1. Ces protéines portent un motif Di-Leucine nécessaire pour leur transport au mélanosome (Blagoveshchenskaya et al., 1999 ; Calvo et al., 1999 ; Simmen et al., 1999 ; Vijayasaradhi et al., 1995) reconnus par AP-1 et AP-3 pour la Tyrosinase et uniquement par AP-1 pour Tyrp1 (Theos et al., 2005). De manière cohérente avec ces observations, la perte de fonction d'AP-3 n'affecte que partiellement la localisation de la Tyrosinase aux mélanosomes et n'affecte pas Tyrp1 (Theos et al., 2005), alors que la perte de fonction d'AP-1 affecte au moins Tyrp1 (Delevoye et al., 2009). AP-1 intervient dans ce cas dans le transport de cargos des endosomes de recyclage aux mélanosomes, via des tubules connectant directement ces deux compartiments le long desquels AP-1 et ses cargos circulent grâce à l'interaction entre AP-1 et la kinésine Kif13A (Delevoye et al., 2009). L'interaction entre AP-1 et Kif13A dans les mélanocytes permet aussi une fonction supplémentaire, non-canonique d'AP-1 dans le positionnement de l'endosome de recyclage à proximité des mélanosomes. AP-1 est aussi nécessaire à la formation des Weibel-Palade Bodies (WPB) des cellules endothéliales humaines, d'autres organites apparentés aux lysosomes (Lui-Roberts et al., 2005). Ce processus semble faire appel à une autre fonction non-canonique d'AP-1. Ces fonctions non-canoniques seront détaillées plus loin (page 24).



**Figure 12. AP-1 dans la mélanogénèse.** AP-1 transporte Tyrp-1 le long de tubules reliant les endosomes de recyclage aux mélanosomes. Ce transport se fait le long de microtubules via l'interaction d'AP-1 avec la Kinésine Kif13A. Adapté de Delevoye et al., 2009.

## 1.4 Importance physiologique d'AP-1 *in vivo*

### *Organismes unicellulaires*

*Levures.* En conditions de laboratoire, AP-1 n'est pas nécessaire à la survie des organismes unicellulaires (il ne l'est pas non plus pour celle des cellules de métazoaires en culture) bien qu'il intervienne dans plusieurs processus cellulaires. Cette viabilité chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* ne s'explique pas par l'éventuelle existence d'hémicomplexes fonctionnels chez ces organismes (voir page 93), la délétion de toutes les sous-unités d'AP-1 chez *S. cerevisiae* (Yeung et al., 1999) et la délétion d'au moins une sous-unité de chaque hémicomplexe chez *S. pombe* (Ma et al., 2009) restent viables et ne s'accompagnent que de défauts de croissance. Chez ces levures (au moins chez *S. pombe*), il apparaît pourtant qu'AP-1 est impliqué dans la cytokinèse : chez *S. cerevisiae*, AP-1 contrôle le trafic de Chs3, une enzyme servant à synthétiser la paroi cellulaire à la jonction entre la cellule fille et la cellule mère (Valdivia et al., 2002) ; chez *S. pombe*, la perte de fonction de  $\mu$ 1 aggrave les défauts de cytokinèse des mutants Calcineurine (Kita et al., 2004), les mutants AP-1 présentent des défauts de cytokinèse (Ma et al., 2009), et AP-1, en coopération avec SIP1 (l'orthologue de Laa1/p200), est nécessaire pour l'adressage de l'enzyme Bsg1 servant à synthétiser la paroi cellulaire (Yu et al., 2012). De plus,  $\mu$ 1 interagit physiquement avec le composant des centres organisateurs des microtubules Sad1 (Kita et al., 2004) et une version de  $\mu$ 1 fusionnée à la GFP localise à ces centres organisateurs pendant la division (Ma et al., 2009), suggérant une éventuelle fonction de  $\mu$ 1 en dehors du complexe. De manière intéressante, chez les plantes, dont la cytokinèse requiert aussi la formation d'une paroi cellulaire entre les deux cellules filles, la perte de fonction d'AP-1 induit aussi des défauts de cytokinèse, vraisemblablement dus à un défaut d'adressage de la syntaxine cytokinèse-spécifique KNOLLE à la membrane plasmique entre les deux cellules filles (Teh et al., 2013).

*Protozoaires.* Chez l'amibe sociale *D. discoideum*, les mutants  $\mu$ 1 présentent un défaut de la biogénèse de la vacuole contractile, un organite osmorégulateur dérivé du lysosome, consistant avec le rôle d'AP-1 dans la biogénèse lysosomale (Lefkir et al., 2003a), et un défaut inattendu de phagocytose, un processus d'internalisation de grosses (>1  $\mu$ m) particules (Lefkir et al., 2003b). Ce rôle d'AP-1 pourrait s'expliquer par une fonction canonique d'AP-1 dans le transport vésiculaire à la surface plasmique de protéines transmembranaires nécessaires à la phagocytose, ou une fonction non-canonique qui sera

abordée page 25. Ce rôle d'AP-1 dans la phagocytose est en tout cas conservé dans les macrophages de souris (Lefkir et al., 2003b, Braun et al., 2007) et les cellules HeLa (Pizarro-Cerdá et al., 2007). Chez le trypanosome *T. Brucei* (le parasite responsable de la maladie du sommeil), la déplétion de  $\mu 1$  est létale aussi bien au stade procyclique (dans l'insecte vecteur) qu'au stade prolifératif (dans le flux sanguin de l'homme) du parasite. Ces défauts sont dus au stade procyclique à un défaut de transport lysosomal, qui n'est plus observé au stade prolifératif en raison d'une adaptation du transport à la vie dans le flux sanguin. A ce stade, la létalité pourrait plutôt s'expliquer par un défaut d'adressage d'un récepteur à la surface de la cellule, nécessaire pour l'activité endocytaire accrue du parasite dans le sang (Tazeh et al., 2009). Enfin, AP-1 est nécessaire à l'infectiosité du parasite *Leishmania*. La perte de fonction d'AP-1 entraîne des défauts de trafic lysosomal et un défaut d'assemblage de son flagelle (Vince et al., 2008), un phénotype probablement dû à une fonction conservée d'AP-1 chez les métazoaires dans l'assemblage du cil cellulaire, un organe apparenté (voir page 40).

### *Organismes pluricellulaires*

AP-1 est essentiel au développement des organismes pluricellulaires. Chez *C. elegans* la déplétion et/ou la mutation de chacune des sous-unités d'AP-1 induit une létalité embryonnaire, à l'exception des deux isoformes de  $\mu 1$  dont la perte de fonction induit une létalité plus tardive au stade larvaire. La létalité embryonnaire est restaurée quand les deux isoformes sont affectées à la fois, indiquant que ces deux isoformes sont partiellement redondantes au stade embryonnaire mais pas au stade larvaire (Shim et al., 2000). Dans cet organisme, ces isoformes accomplissent cependant des fonctions spécialisées dans le tri polarisé en cellules épithéliales pour l'isoforme APM-1 et neuronales pour l'isoforme UNC-101 (Dwyer et al., 2001 ; Bae et al., 2006 ; Sakaguchi-Nakashima et al., 2007 ; Margeta et al., 2009 ; Zhang et al., 2012 ; Shafaq-Zadah et al., 2012 ; voir page 40).

Chez *D. melanogaster*, des mutants  $\mu 1$  meurent au premier stade larvaire (Benhra et al., 2011) mais la fonction d'AP-1 a pu être étudiée à des stades plus tardifs du développement dans différents tissus grâce à des outils génétiques permettant le contrôle de l'expression spatio-temporelle d'ARN interférent et la génération d'animaux mosaïques, dans lesquels seule une fraction de cellules sont homozygotes pour AP-1 (page 58). AP-1 a ainsi été identifié comme un régulateur négatif de la voie Notch (Benhra et al., 2011 ; Le Bras et al., 2012), une voie de

signalisation entre cellules voisines mettant en jeu un récepteur transmembranaire Notch, son partenaire transmembranaire Sanpodo et un ligand lui aussi transmembranaire Delta, lors de divisions asymétriques pendant le développement pupal. A l'issue de ces divisions asymétriques, la voie Notch n'est activée que dans une seule des deux cellules filles. Cette activation unidirectionnelle de Notch est contrôlée par Numb, une protéine ségrégant asymétriquement dans une seule des cellules filles et y modulant l'activité d'AP-1 (Cotton et al., 2013 ; Couturier et al., 2013) sur le recyclage de Notch via celui Sanpodo à la membrane plasmique. Il a aussi été observé que la déplétion d'AP-1 pendant la formation de l'œil au stade larvaire induit un adressage anormal de Notch au trafic lysosomal et sa dégradation (Kametaka et al., 2012), passant (probablement comme avec Sanpodo dans la division asymétrique) par un défaut de trafic d'un régulateur tissu-spécifique de Notch, AP-1 n'interagissant pas directement avec Notch (Kametaka et al., 2012). Enfin, AP-1 a également été impliqué dans la formation de granules sécrétoires à la fin du développement larvaire (Burgess et al., 2011 ; Torres et al., 2014, voir page 25).

Chez le poisson-zèbre *Danio rerio*, la déplétion par morpholino de l'isoforme  $\sigma 1A$  ubiquitaire induit 50% de létalité embryonnaire, des défauts de pigmentation sans doute dus à la fonction d'AP-1 dans la mélanogénèse (page 19), et des défauts de motilité dus à un développement neuronal anormal (Montpetit et al., 2008). La déplétion par morpholino de  $\mu 1B$ , spécifiquement exprimé dans des épithélia d'origine endodermique, induit une létalité larvaire à 7,8 jours après fécondation (4,8 jours après la fin du développement embryonnaire) et des défauts de formation des organes dérivant de ces épithélia, comme le foie, l'intestin et le rein (Zizioli et al., 2010). Enfin, un mutant de  $\beta 1$  présente une dégénérescence des cellules épithéliales ciliées de l'oreille interne, probablement due à un défaut de tri polarisé (Clemens-Grisham et al., 2013 et voir page 37).

Chez la souris, la délétion de la sous-unité  $\gamma 1$  ubiquitaire cause une létalité embryonnaire à 3,5 jours après la fécondation (Zizioli et al., 1999) alors que la délétion de  $\mu 1A$ , ubiquitaire chez les souris, induit une létalité plus tardive, à 13,5 jours post-fécondation (Meyer et al., 2000). Ce développement en l'absence de  $\mu 1A$  peut s'expliquer par la présence de la sous-unité  $\mu 1B$  spécifique des épithélia (voir page 37). De même, la délétion de  $\mu 1B$  n'empêche pas le développement embryonnaire grâce à sa compensation par  $\mu 1A$ . Les souris mutantes pour  $\mu 1B$  ne meurent qu'environ 8 semaines après la naissance mais présentent des inflammations

du colon et un défaut de polarité apico-basale des cellules intestinales (Takahashi et al., 2011, Hase et al., 2013, voir page 37).

Chez l'humain, AP-1 étant nécessaire au développement, les seules pathologies connues liées à AP-1 concernent des mutations d'isoformes pouvant être compensées par d'autres isoformes. Des mutations de  $\sigma 1A$ , une isoforme ubiquitaire, causent dans quatre familles un syndrome neuro-cutané, avec retard mental, entéropathie, surdité, neuropathie périphérique, ichthyose et kératodermie (Mednik syndrom, Montpetit et al., 2008). D'autres mutations de  $\sigma 1B$ , une isoforme exprimée uniquement au système nerveux central, causent un retard mental lié au chromosome X (Tarpey et al., 2006, Borck et al., 2008).

### 1.6 Importance d'AP-1 dans les maladies infectieuses

Le complexe majeur d'histocompatibilité I (CMH-I) est une protéine transmembranaire exprimée par toutes les cellules nucléées chez la plupart des vertébrés, permettant aux cellules infectées par un virus de présenter à leur surface des fragments de protéines virales reconnues par des lymphocytes T cytotoxiques. Cette reconnaissance de molécules du non-soi active les lymphocytes T, qui détruisent alors la cellule infectée en relâchant des perforines et des granzymes. Certains virus échappent à cette détection en détournant les machineries de trafic intracellulaire pour réduire les niveaux de CMH-I présentés à la surface. C'est le cas du VIH, un rétrovirus infectant l'homme et responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). La protéine virale Nef joue le rôle d'adaptateur entre la queue cytosolique de MHC-I et AP-1 (Roeth et al, 2004) via sa sous-unité  $\mu 1$  (Noviello et al., 2008 ; Wonderlich et al., 2008, Singh et al., 2009), possiblement en reconstituant en interaction avec MHC-I un site tyrosine (Noviello et al., 2008), de manière Arf-1-dépendante (Wonderlich et al., 2011). MHC-I est alors re-routé à la voie de transport lysosomale au lieu d'être adressé à la membrane plasmique et finit par être dégradé (Roeth et al, 2004). Une fois le virus assemblé, AP-1 participe aussi à son bourgeonnement viral via une interaction physique entre la matrice du virus et  $\mu 1$ , probablement en le transportant vers des zones de bourgeonnement actif (Camus et al., 2007).

La fonction d'AP-1 dans la phagocytose est aussi requise pour l'internalisation de *Listeria monocytogenes* dans les cellules (Pizarro-Cerdá et al., 2007 ; voir page 25). Enfin, AP-1 est nécessaire pour l'endocytose clathrine-dépendante de l'anthrax, une toxine produite par

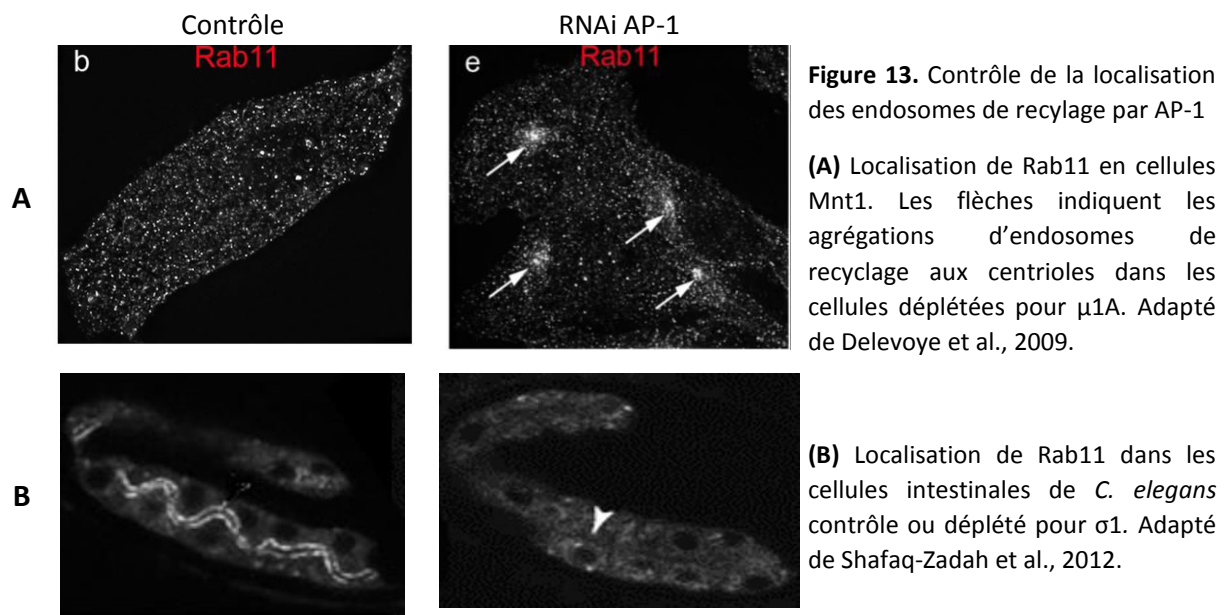
*Bacillus anthracis* (Abrami, et al., 2010). Les auteurs proposent un modèle d'endocytose directe médiée par AP-1 plutôt que par AP-2 (une hypothèse aussi formulée par Kim & Ryan, 2009) mais ne peuvent écarter la possibilité qu'AP-1 intervienne plus classiquement en adressant à la membrane plasmique un récepteur reconnaissant la toxine.

### 1.6 Fonctions non-canoniques d'AP-1

Selon les organismes et les types cellulaires, AP-1 présente en plus de son rôle canonique dans le transport vésiculaire des fonctions non-canoniques.

*Positionnement des endosomes de recyclage.* Lors de la mélanogénèse, en plus de faire transiter des cargos des endosomes de recyclage au mélanosome, AP-1 positionne aussi directement les endosomes de recyclage à proximité des mélanosomes. Cette fonction est permise par l'interaction d'AP-1 avec la kinésine KIF13A, un moteur moléculaire se déplaçant le long des microtubules en direction de leur extrémités +. Les endosomes de recyclage présentent une distribution homogène dans les cellules mélanocytaires en culture Mnt-1 en présence d'AP-1 et s'agrègent à proximité du centriole en absence d'AP-1 (figure 13 page 25). Cette redistribution au centriole s'explique par la polarité des microtubules dans ces cellules : les extrémités - sont situées au centriole et leur extrémité + sont dirigées vers la périphérie de la cellule. En l'absence d'AP-1 ou de KIF13A, le déplacement vers les extrémités + est compromis et le déplacement vers les extrémités -, vraisemblablement par une dynéine, achemine les endosomes de recyclage au centriole (Delevoye et al., 2009). En cellules HeLa, les endosomes de recyclage sont positionnés de la même façon par AP-1 mais cette fonction passe dans ce contexte par son interaction avec la kinésine KIF5B via la protéine Gadkin (Schmidt et al., 2009). AP-1 positionne aussi les endosomes de recyclage dans l'intestin de *C. elegans*, où ils localisent au pôle apical des cellules épithéliales de manière AP-1-dépendante (Figure 13 page 25, Zhang et al., 2012, Shafaq-Zadah et al., 2012). L'implication d'un moteur moléculaire coopérant avec AP-1 dans ce contexte reste à démontrer.





**Formation de granules sécrétoires.** Les WPB (Weibel Palade Bodies) sont des organites apparentés aux lysosomes présents dans les cellules endothéliales humaines, stockant et sécrétant le facteur von Willebrand intervenant dans l'adhésion des plaquettes aux parois des vaisseaux sanguins. AP-1 et la clathrine sont requis pour la biogénèse de ces organites spécialisées, mais leur fonction dans ce processus ne passe pas uniquement par le contrôle du trafic vésiculaire. AP-1 et la clathrine forment sur ce compartiment un échafaudage moléculaire recouvrant l'ensemble de l'organite (pouvant avoir une longueur de 5 $\mu$ m) au lieu d'assembler classiquement des vésicules d'une centaine de nanomètres de diamètre (Lui-Roberts et al., 2005). AP-1 et la clathrine jouent des rôles indépendants dans la formation puis dans la sécrétion de ces compartiments, via les effecteurs Aftiphilin et  $\gamma$ -synergine d'AP-1 (Lui-Roberts et al., 2008). Chez *D. melanogaster*, AP-1 est aussi requis pour la formation de granules sécrétoires dans la glande salivaire, possiblement via le même mécanisme étant donné qu'il recouvre l'ensemble de la surface de ces granules sécrétoires (Burgess et al., 2011, Torres et al., 2014).

**Phagocytose.** Le rôle d'AP-1 dans la phagocytose a été démontré chez l'amibe *D. discoideum*, les macrophages de souris et les cellules humaines HeLa (voir pages 20 et 23). Ce rôle pourrait impliquer une fonction canonique d'AP-1 dans l'adressage à la surface de la cellule d'une protéine nécessaire à la phagocytose. Dans ces trois modèles, il apparaît pourtant qu'AP-1 localise transitoirement à la membrane plasmique à la coupe phagocytaire (l'invagination



initiale de la membrane) aux étapes précoces de la phagocytose, pouvant suggérer une fonction non canonique d'AP-1 dans l'assemblage de cette structure (Lefkir et al., 2003b ; Braun et al., 2007 ; Pizarro-Cerdá et al., 2007). Ce recrutement à la membrane plasmique est médié comme c'est habituellement le cas aux membranes du TGN et des endosomes (voir page 8) par les PI(4)P (Pizarro-Cerdá et al., 2007) et Arf1 (Braun et al., 2007).

*Ancrage vésiculaire avant la fusion ?* Comme décrit page 14, AP-1 interagit physiquement avec des domaines de la protéine GCC185 permettant l'ancrage des vésicules retournant au TGN pendant le transport rétrograde (Brown et al., 2011), suggérant un rôle d'AP-1 dans cet ancrage. Ce rôle impliquerait qu'AP-1 ne soit pas détaché de la vésicule dans le transport rétrograde. Le rôle d'AP-1 passant dans ce cas par la protéine PACS-1, il est envisageable que la régulation du détachement d'AP-1 décrite page 10 ne s'applique pas à cette voie précise.

## Chapitre 2

### Polarité épithéliale, jonctions d'adhérence et trafic polarisé

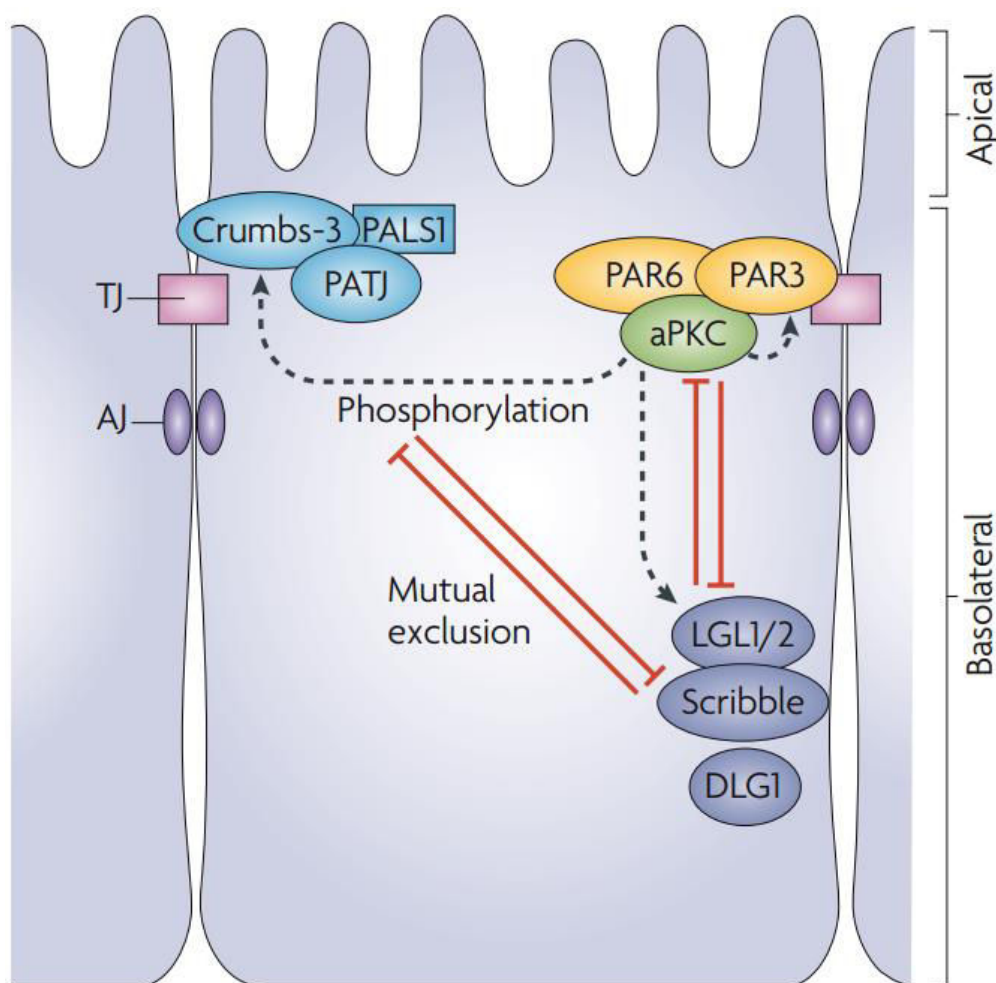
La polarité cellulaire correspond à une organisation asymétrique des cellules en « pôles » distincts, qui se traduit aussi bien par l'organisation de leur cytosquelette que le positionnement de leurs organites ou la spécification de domaines différents à la membrane plasmique. C'est par exemple le cas des neurones, dont le fonctionnement dépend de l'organisation de prolongements dendritiques et axonaux distincts, ou des cellules en migration réorganisant leur cytosquelette d'actine pour former des filopodes et lamellipodes à leur front de migration.

Une nouveauté évolutive qui distingue les métazoaires des autres règnes du vivant est l'association étroite de cellules les unes aux autres pour s'organiser en un feuillet appelé épithélium, séparant le milieu externe d'une cavité interne et capable de contrôler les échanges de molécules entre les deux. Au fur et à mesure que les animaux se sont complexifiés au cours de l'évolution, la délimitation de leurs organes ou leurs compartiments a aussi été assurée par les épithélia. Au-delà d'un rôle purement mécanique de barrière, le contact avec deux milieux différents peut impliquer une vectorialité du fonctionnement de l'épithélium, par exemple pour n'absorber des nutriments que du côté de la lumière intestinale, ou ne sécréter les composants de la cuticule des insectes que du côté faisant face à l'extérieur de l'organisme. Cette vectorialité repose sur une asymétrie entre les deux faces de l'épithélium, un type de polarité cellulaire appelée polarité apico-basale.

#### 2.1 Description de la polarité apico-basale

La polarité apico-basale des épithélia se traduit par l'organisation de la cellule en un pôle apical et un pôle basolatéral séparés entre eux par des jonctions intercellulaires. Le pôle basolatéral contacte via la face basale de la cellule une matrice extracellulaire appelée membrane basale et comprend la majeure partie de la membrane latérale de la cellule, le long de laquelle elle contacte la membrane latérale des cellules épithéliales voisines. Le pôle apical fait face au milieu extérieur ou à la lumière de cavités internes (à quelques exceptions près, voir *Formation de l'épithélium folliculaire* page 34), et est souvent couvert de microvillosités,

des extensions membranaires longues de 0,1 à 2  $\mu\text{m}$  contenant des filaments d'actines fasciculés et impliquées dans l'absorption ou la sécrétion (Bray et al., 1986). Ce pôle comprend une petite partie de la surface latérale de la cellule, appelée surface apico-latérale. Les deux pôles diffèrent d'une part de par leur composition lipidique : le pôle apical est plus riche que le pôle basolatéral en glycosphingolipides (37% contre 19%) et plus pauvre en phosphatidylcholines (9% contre 32%, Simmons et al. 1988). De plus, le pôle basolatéral est enrichi en PI(3,4,5)P3 et le pôle apical en PI(4,5)P2 et ces enrichissements respectifs sont nécessaires pour la polarité épithéliale (Gassama-Diagne 2006 ; Claret et al., 2014). L'acquisition et le maintien de l'identité apicale ou basale de la membrane plasmique sont déterminés par trois complexes de protéines de polarité, les complexes PAR et CRB en apical et le complexe SCRIB en basolatéral. Ces complexes et leur fonction dans la polarité épithéliale étant conservés chez *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*, leur découverte et leur étude a beaucoup bénéficié de la puissance des cribles génétiques menés chez ces organismes modèles. Leur fonctionnement sera détaillé dans la partie suivante.



**Figure 14.** Organisation des domaines d'une cellule épithéliale de mammifère. Trois complexes de protéines de polarité résident aux pôles apical ou basolatéral, séparés entre eux par des jonctions intercellulaires. TJ : Jonctions serrées ; AJ : jonctions d'adhérence. Adapté de Iden & Gollard, 2008.

*Complexe PAR.* Les premiers membres du complexe PAR, Par-3 et Par-6 (pour partition-defective), ont été découverts en 1988 (Kemphues et al.) lors d'un crible génétique mené chez *C. elegans* visant à identifier des régulateurs de la division asymétriques de l'embryon. L'implication du complexe dans la polarité épithéliale a été découverte dix ans plus tard chez les mammifères quand le troisième membre du complexe, aPKC (atypical Protein Kinase C) et Par-3 ont été décrits comme interagissant physiquement et colocalisant au pôle apical de cellules épithéliales MDCK en culture (Izumi et al., 1998) et contrôlant la polarité épithéliale (Suzuki et al., 2001). En plus de ses rôles conservés dans la division asymétrique, ce complexe a été impliqué et étudié en détail dans la polarisation dans d'autres contextes cellulaires chez les animaux, tels que le développement de l'ovocyte, le développement neuronal et la migration cellulaire polarisée (voir Goldstein et Macara, 2007 pour revue), l'établissant comme un régulateur fondamental de la polarité cellulaire chez les animaux. Le complexe PAR localise asymétriquement dans les cellules dont il contrôle la polarité. Bien qu'elles interagissent physiquement entre elles, selon le contexte cellulaire, les trois protéines peuvent ne colocaliser que partiellement, comme c'est le cas dans les cellules épithéliales de la drosophile où Par-3 localise aux jonctions et Par-6/aPKC à l'ensemble du pôle apical (voir *Etablissement de la polarité épithéliale* page 33). Par-3 et Par-6 sont des protéines cytosolubles portant des domaines PDZ permettant des interactions avec d'autres protéines et les phosphoinositides des membranes, cohérent avec le rôle de ces protéines dans le recrutement de protéines effectrices à la membrane plasmique, et aPKC est une protéine kinase, la seule sous-unité du complexe à posséder une activité catalytique.

*Complexe CRB.* La seule protéine transmembranaire des complexes de polarité, Crumbs (Crb), a été décrite chez la Drosophile en 1990 (Tepass et al.) comme un composant de la surface apicale des cellules épithéliales, dont la perte de fonction empêche la polarisation et la surexpression cause une expansion du domaine apical (Wodarz et al., 1995), la définissant comme une protéine déterminant l'identité apicale. Les protéines cytoplasmiques Stardust (Sdt) et Patj, dont la perte de fonction perturbe aussi la polarité épithéliale (Tepass & Knust, 1993, Bhat et al. 1999) et interagissant physiquement avec Crb (Hong et al., 2001, Bachmann et al., 2001, Bhat et al. 1999) ont depuis été caractérisées comme les deux autres membres de ce complexe.

*Complexe SCRIB.* Les protéines Scribbles (Scrib), Lethal Giant Larvae (Lgl) et Discs Large (Dlg) ont été identifiées comme un complexe de la polarité basolatérale chez la Drosophile en 2000 (Bilder & Perrimon, Bilder et al.). Les cellules épithéliales mutantes pour chacun de ces gènes présentent un défaut identique de polarité se traduisant par une présence de protéines normalement exclusivement apicales comme Crb, Patj et les composants des jonctions d'adhérence (voir plus loin). Les trois protéines localisent de manière mutuellement dépendante à l'ensemble du pôle basolatéral, au pôle apico-latéral ou uniquement aux jonctions latérales en fonction du contexte cellulaire et du stade développemental et interagissent génétiquement (bien que non physiquement) entre elles dans un même mécanisme visant à restreindre l'activité des protéines apicales (Bilder & Perrimon, 2000, Bilder et al., 2000).

*Cdc42.* Les trois complexes de polarité interagissent entre eux pour mettre en place et maintenir la polarité épithéliale (voir page 33). L'intervention de Cdc42, une petite GTPase ayant un rôle central dans la polarité de toutes les cellules eucaryotes (voir Etienne-Manneville, 2004 pour revue), sera décrite pages 41 et 44.

*Jonctions Serrées/septées.* Les pôles apicaux et basolatéraux sont séparés entre eux par deux types de jonctions intercellulaires organisées en ceintures : les jonctions serrées/septées et les jonctions d'adhérence. Malgré le fait que les jonctions serrées des mammifères et les jonctions septées des insectes présentent des localisations différentes (les jonctions serrées sont plus apicales et les jonctions septées plus basales que les jonctions d'adhérence), des aspects différents quand observées en microscopie électronique (à l'origine de leurs noms différents), et des compositions protéiques partiellement différentes, elles jouent toutes les deux un rôle de barrières paracellulaires, qui filtrent le passage de molécules d'un côté de l'épithélium à l'autre entre les cellules (diffusion paracellulaire). Cette fonction fait intervenir dans les deux cas des protéines transmembranaires conservées appelées Claudines impliquées dans des interactions homophiliques et/ou hétérophiliques. Chez *C. elegans*, bien que leur localisation à un complexe jonctionnel donné reste à confirmer, des Claudines jouent aussi le rôle de barrières paracellulaires (voir Simske, 2013 pour revue).

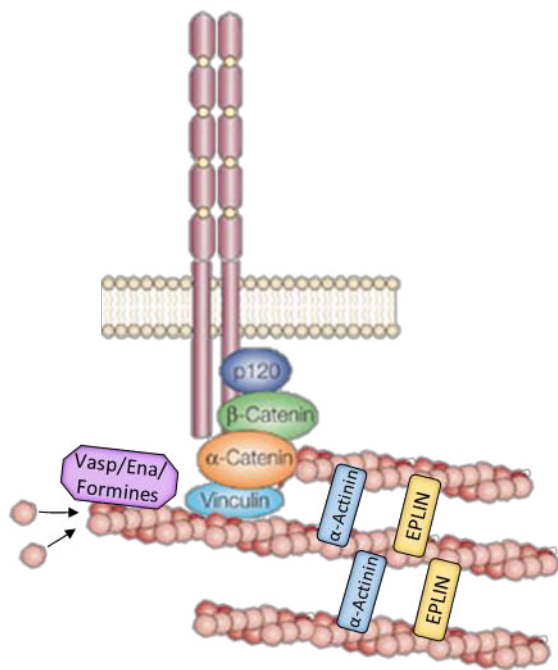
*Jonctions d'adhérence.* Les jonctions d'adhérence, comme leur nom l'indique, jouent un rôle prépondérant dans l'adhésion des cellules épithéliales entre elles et donc dans la cohésion du tissu. La modulation de cette adhésion au cours du développement joue un rôle critique pour

conférer aux tissus épithéliaux la plasticité nécessaire aux mouvements morphogénétiques et aux phénomènes de transitions épithélio-mésenchymateuse qu'ils subissent, et pour les stabiliser dans les tissus matures. Au-delà d'un simple rôle d'adhésion, les jonctions d'adhérence interviennent aussi dans l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire et dans des remodelages du tissu lors de mouvement morphogénétique, pendant lesquels le couplage entre un cytosquelette contractile d'actomyosine aux jonctions d'adhérence (voir page suivante) permet des changements de forme et/ou de voisins des cellules épithéliales (Lecuit & Lenne, 2007 pour revue et voir page 43). Le composant majeur des jonctions d'adhérence est le complexe Cadhérine/Caténines mais ces jonctions contiennent d'autres composant comme la molécule d'adhésion Nectine et son partenaire cytosolique Afadine, ainsi que Par-3.

*Cadhérines.* Des observations de longue date (Holtfreter 1939) montrent qu'au cours du développement, les cellules possèdent des propriétés d'adhésivité sélective : en effet, les cellules d'un embryon désagrégé par digestion de la matrice extracellulaire sont capables de se réassocier spécifiquement entre elles en fonction de leur feuillet embryonnaire d'origine. Les Cadhérines ont initialement été identifiées comme des molécules conférant cette propriété aux cellules (Yoshida & Takeichi 1982). Les Cadhérines sont des protéines transmembranaires définies par des domaines extracellulaires capables de s'associer en *trans* (entre deux cellules opposées) par interaction homophile (uniquement avec des Cadhérines du même type), expliquant à la fois leurs propriétés adhésives et sélectives. Les Cadhérines peuvent aussi s'associer en *cis* (sur la même membrane), ce qui pourrait jouer un rôle dans leur regroupement entre elles. L'interaction homophile entre Cadhérines dépend du calcium, d'où leur dénomination (calcium-dependent adhesion proteins). Les Cadhérines sont des composants clés de l'organisation multicellulaire des métazoaires et sont présentes dans le génome de tous les métazoaires séquencés et leurs plus proches parents unicellulaires, les choanoflagellés, mais absentes d'autres organismes multicellulaires comme les plantes, les fungi ou l'amibe sociale *D. discoideum*.

*Complexe Cadhérine/Caténine/Actine aux jonctions d'adhérence.* Les Cadhérines dites classiques se distinguent de par leur domaine intracellulaire extrêmement conservé des éponges aux vertébrés (Nichols et al., 2012), capable de lier des protéines solubles appelées Caténines, assurant un lien entre les Cadhérines et le cytosquelette d'actine assemblé sous la membrane plasmique et contrôlant leur trafic membranaire (voir page 43). Les Cadhérines

classiques sont au nombre d'une trentaine chez les mammifères et de seulement trois chez la *Drosophile*. Parmi elles, la plus représentée dans les épithéliums est E-Cadhérine (E-Cad). Le domaine cytoplasmique de E-Cad lie  $\beta$ -Caténine ( $\beta$ -Cat), qui lie à son tour  $\alpha$ -Caténine ( $\alpha$ -Cat).  $\alpha$ -Cat est sous forme d'homodimère quand elle est libre dans le cytosol et en hétérodimère avec  $\beta$ -Cat quand elle est incluse dans le complexe Cadhérine/Caténines (Yamada et al., Drees et al., 2005). Une fois dans ce complexe,  $\alpha$ -Cat se lie aux filaments d'actines, directement (l'interaction directe entre  $\alpha$ -Cat et l'actine quand  $\alpha$ -Cat est intégrée au complexe E-Cad/ $\beta$ -Cat est encore aujourd'hui un sujet de controverse, voir Han & Yap 2013 pour revue) et/ou via la Vinculine, une autre protéine liant l'actine présentant une importante homologie de séquence protéique et de structure avec  $\alpha$ -Cat.  $\alpha$ -Cat et Vinculine jouent un rôle critique lors de la formation des jonctions d'adhérence en recrutant VASP et Enabled (Vasioukhin et al., 2000) et possiblement des Formines (Kobielak et al., 2004, Drees 2005), des protéines permettant l'extension des polymères d'actine.  $\alpha$ -Cat recrute également EPLIN, une protéine permettant d'organiser les filaments d'actines en fibres parallèles serrées (Abe et al., 2008).  $\alpha$ -Actinine, une protéine ayant une fonction similaire, pourrait aussi être recrutée par la Vinculine (Kroemker et al., 1994). Les jonctions d'adhérence sont initialement organisées en puncta bien définis comprenant de quelques dizaines à quelques centaines de molécules de E-Cadhérine, dont la taille dépend d'une balance entre des mécanismes de fusion et de fission (Quang et al., 2013). La polymérisation de l'actine induite par le complexe Cad/Cat stabilise



**Figure 15.** Complexe Cadhérine/Caténine/Actine.

E-Cad recrute  $\beta$ -Cat, qui recrute  $\alpha$ -Cat, qui recrute la Vinculine.  $\alpha$ -Cat et la Vinculine assurent le lien physique entre la cadhérine et le cytosquelette d'actine et recrutent EPLIN et  $\alpha$ -Actinine, des protéines liant parallèlement les fibres d'actines entre elles, ainsi que les polymérisateurs d'actine Vasp, Ena et peut-être des Formines. Adapté de Gumbiner, 2005.

ces puncta en antagonisant les événements de fission mais n'affecte pas les événements de fusion, qui sont plutôt régulés par les interactions en *trans* et en *cis* entre molécules de E-Cad

(Quang et al., 2013). L'ensemble des puncta finit par fusionner pour former une jonction d'adhérence mature en ceinture appelée Zonula Adherens (ZA) (Vasioukhin et al., 2000).

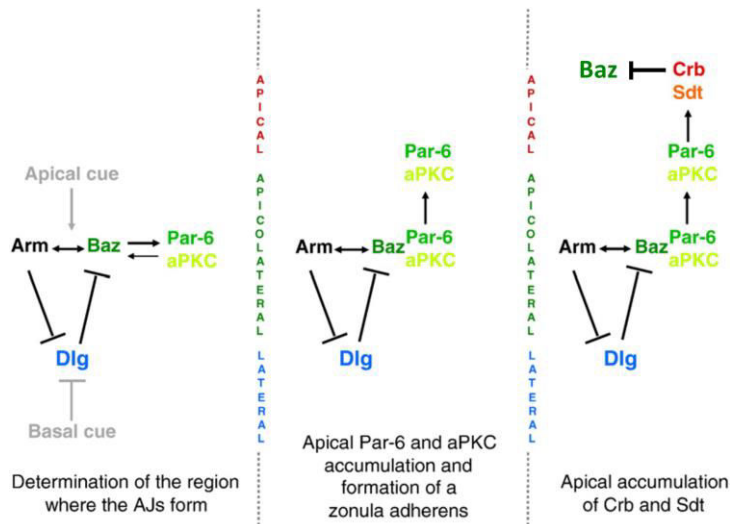
## 2.2 Etablissement de la polarité épithéliale

Les composants des complexes apicaux, jonctionnels et basolatéraux interagissent entre eux pendant la mise en place de la polarité épithéliale. La nature et la chronologie de ces interactions ont été étudiées chez la drosophile lors de deux processus différents de formation des épithélia. Les épithélia de la Drosophile peuvent avoir deux origines différentes : le blastoderme de l'embryon de Drosophile est formé *de novo* pendant la cellularisation, un mécanisme au cours duquel des membranes croissent et s'invaginent entre les noyaux d'un syncytium pour les isoler les uns des autres. Certaines cellules gardent leur identité épithéliale jusqu'à la vie adulte de l'organisme, sans passer par un intermédiaire mésenchymateux (c'est par exemple le cas de l'épiderme de la drosophile). Au contraire, certains épithélia sont formés à partir de cellules mésenchymateuses subissant des transitions mésenchymo-épithéliales. C'est le cas de l'épithélium folliculaire de la Drosophile.

*Formation du blastoderme.* La première étape de la polarisation du blastoderme est le recrutement apical de Par-3 (Bilder et al., 2003 ; Tanentzapf and Tepass, 2003). Ce recrutement est indépendant de ses partenaires Par-6 et aPKC et des composants des jonctions d'adhérence, mais requiert un réseau apical d'actine et un transport médié par la dynéine le long d'un réseau polarisé de microtubules (Harris & Peifer 2005). Par-3 organise les jonctions d'adhérence à la membrane apico-latérale où il est présent (Harris & Peiffer, 2004). E-Cad et les Caténines existent sous forme de clusters mobiles à la membrane plasmique avant le recrutement apical de Par-3 et sont repositionnés par Par-3 (McGill et al., 2009). Ce repositionnement passe par le recrutement par Par-3 de Bitesize, qui permet via son interaction avec Moesin d'établir un domaine où la polymérisation de l'actine stabilise les clusters d'E-Cad (Pilot et al., 2006). Par-3 recrute aussi Par-6, aPKC et Crumbs (Harris & Peifer 2005) à un domaine membranaire plus apical. L'identité basolatérale de la membrane est déterminée par l'activité du complexe Scribbles/Dlg1, qui antagonise l'activité de Par-3. L'activité de Scribbles/Dlg1 est elle-même antagonisée au domaine apical par Crumbs, qui assure ainsi l'acquisition et le maintien d'une identité apical au-dessus des jonctions/Par-3. (Bilder et al., 2003 and Tanentzapf and Tepass, 2003).



*Formation de l'épithélium folliculaire.* Les cellules mésenchymateuse précurseurs de l'épithélium folliculaire sont générées par des divisions de cellules souches et migrent au contact d'un cyste germinale autour duquel elles s'assemblent en épithélium (la formation de la chambre d'œuf sera décrite en détail dans le chapitre suivant). Aux premières étapes de la formation de l'épithélium, Par-3 et les composants de jonctions E-Cad et  $\beta$ -Cat s'accumulent à la membrane plasmique dans des structures ponctuées proches du cyste germinale, qui coalescent comme dans le blastoderme en une ZA en ceinture, indiquant la formation de jonctions à ce domaine. A peine détectables aux premiers stades, Par-6 et aPKC s'enrichissent quant à eux progressivement sur toute la surface au contact du cyste germinale. Comme pour la formation du blastoderme, la localisation de Par-3 aux jonctions ne dépend pas de Par-6 et aPKC, et Par-3 est requis pour leur recrutement au domaine membranaire au-dessus des jonctions. Contrairement à la formation du blastoderme, Par-3 n'est par contre pas requis pour la formation des jonctions mais plutôt, de même que Par-6 et aPKC, pour leur distribution précise en ceinture apico-latérale, et les jonctions elles-mêmes sont requises pour la localisation correcte de Par-3, Par-6 et aPKC. Le complexe Crb/Sdt présente la même localisation bien que plus tardivement que Par-6 et aPKC au contact du cyste germinale, de manière dépendante de Par-3, Par-6 et aPKC (Franz & Riechman, 2010). Crb lui-même exclut Par-3 de la membrane apicale en le décrochant de Par-6 via l'induction de la phosphorylation de Par-3 par aPKC. Un défaut dans ce mécanisme d'exclusion apicale de Par-3 (qui agit aussi dans les cellules photoréceptrice de la Drosophile pendant la formation de la rétine, Walter & Pichaud, 2010) mène à l'assemblage de jonctions au pôle apical (Morais-de-Sa et al., 2010). Pendant la formation des jonctions et la polarisation de la membrane apicale, la protéine latérale Dlg empêche la formation de jonctions et le recrutement de protéines apicales, y compris Par-3. Contrairement à la formation du blastoderme, l'activité de Dlg n'est dans ce cas pas restreinte par Crb mais par les jonctions d'adhérence, qui empêchent sa localisation apicale (Franz & Riechman, 2010).



**Figure 16.** Interactions entre les protéines de polarité pendant la formation de l'épithélium folliculaire. Baz correspond à Par-3 et Arm correspond à  $\beta$ -Cat chez la Drosophile. Adapté de Franz & Riechman, 2010.

En résumé, bien que la séquence de recrutement des différents complexes de polarité soit sensiblement la même entre ces deux modèles de polarisation épithéliale, les relations de dépendance entre les complexes et même entre les composants d'un même complexe diffèrent d'un modèle à l'autre. La polarisation du blastoderme est hiérarchique : le recrutement initial de Par-3 suffit à spécifier où seront assemblées les jonctions et à recruter Crb, qui antagonisera au domaine apical l'activité de Scribbles/Dlg. La polarisation de l'épithélium folliculaire présente des interdépendances entre Par-3 et Par-6/aPKC, entre Par-3 et les jonctions d'adhérence, une fonction de Par-6/aPKC dans le recrutement de Crb/Sdt, et un rôle des jonctions d'adhérence dans l'inhibition de l'activité des protéines latérales en apical.

Ces complexes de polarité sont aussi nécessaires au maintien de la polarité épithéliale, mais là encore leurs relations de dépendance varient d'un tissu à l'autre : ainsi, par exemple chez la Drosophile, le maintien des jonctions d'adhérence dépend de Crumbs dans l'ectoderme de l'embryon (Tepass, 1996) mais pas dans le disque épithélial d'aile (Lu & Bilder, 2005).

### 2.3 Tri apico-basal dans l'épithélium

Le tri polarisé déterminant si un cargo va être adressé à la surface apicale ou basolatérale se fait au TGN pour les protéines directement transportées du TGN à la surface (Keller et al., 2001, Kreitzer et al., 2003), aux endosomes de recyclage pour les protéines internalisées devant être réadressées à la surface et implique à la fois le TGN et les endosomes de recyclage dans les cas où les protéines synthétisées transitent par des intermédiaires endosomaux avant

de rejoindre la surface (Ang et al., 2004, Cresawn et al 2007., Farr et al. 2009). Qu'elles aient été internalisées à la membrane plasmique apicale ou basolatérale, les protéines convergent dans le même compartiment de recyclage (Knight et al. 1995) et y sont ségréguées dans des domaines distincts de ce compartiment, à partir desquels elles sont ensuite adressées aux membranes basolatérale ou apicale (Thompson et al., 2007). L'organisation de sous-domaines distincts dépend de l'activité de la kinase PI3K, ce qui suggère que ces sous-domaines pourraient avoir des compositions lipidiques différentes, et n'est pas observée dans des cellules non polarisées (Thompson et al., 2007). Enfin, les cargos peuvent emprunter une voie appelée transcytose, dans laquelle ils sont transportés à un pôle précis de la cellule, puis endocytés et recyclés à l'autre pôle de la cellule .

### *Tri apical.*

*Radeaux lipidiques et ancres GPI.* Les radeaux lipidiques sont des sous-domaines membranaires riches en cholestérol et en glycosphingolipides, ayant tendance à se regrouper entre eux en « radeaux » dans une bicouche lipidique. Certaines protéines solubles peuvent subir une modification post-traductionnelle les liant de manière covalente à un glycosylphosphatidylinositols (ancres GPI) et les liant donc à la membrane. La majorité de ces protéines ont une localisation apicale dans les épithélia. Les modèles actuels de ce mécanisme de tri encore méconnu proposent que des protéines à ancres GPI sont incorporées dans les radeaux lipidiques au TGN formant ensuite des transporteurs vésiculaires adressés à la membrane plasmique. Ce modèle proposé en 1988 (Simmons et al.) a récemment été étayé par des expériences chez la levure montrant que le TGN était capable de ségréger spécifiquement des radeaux lipidiques et que des vésicules enrichies en glycosphingolipides et cholestérol en dérivait (Klemm et al., 2009, Surma et al., 2011).

*Glycosylation.* La glycosylation correspond à la liaison covalente d'un glucide à une protéine. Elle a lieu lors de la synthèse protéique dans le réticulum endoplasmique (N-glycosylation) et plus tard dans le golgi (O-glycosylation). La glycosylation pourrait permettre l'adressage apical de différentes manières : en permettant à des protéines d'adopter une conformation nécessaire à leur transport, ou en permettant leur association à des récepteurs transmembranaires comme les lectines ou à d'autres régulateurs comme les galectines, des protéines solubles présentes dans la lumière du TGN pouvant induire l'agrégation des protéines glycosylées. (Potter et al., 2006 pour revue).

*Signaux de transcytose apicale.* La transcytose basale-apicale du récepteur aux immunoglobulines pIgR (polymeric IgA Receptor) dans les cellules MDCK est l'exemple le

mieux caractérisé de transcytose, où plgR est transporté du TGN à la surface basolatérale (Orzech et al., 2000) où il capture des immunoglobulines, puis est endocyté et adressé cette fois à la surface apicale – où il est clivé pour relâcher les immunoglobulines capturées – via les endosomes de recyclage (Brown et al., 2000). Cet recyclage apical mais pas le transport bio-synthétique de plgR dépend d'un signal de transcytose d'une dizaine d'acides aminés situé dans la queue cytoplasmique de plgR (Luton et al., 2009).

*Autres.* Le tri apical des protéines transmembranaires peut être contrôlé par d'autres facteurs variés, situés en extracellulaire tels que la nature des glycosaminoglycanes pour les protéoglycanes (Potter et al., 2004), au domaine transmembranaire pour des protéines de virus de la grippe (Kundu et al., 1996), ou à leur queue cytoplasmiques, par exemple pour la Mégaline (Marzolo et al., 2003) et la Rhodopsine (Chuang & Sung 2007).

### *Tri basolatéral.*

Les signaux de tri déterminant l'adressage basolatéral sont moins variés et mieux définis. Les mieux caractérisés à ce jour sont les signaux canoniques YXXØ (où Ø est un acide aminé hydrophobe) et [D/E]XXXL[L/I] interagissant avec différents complexes APs (voir page 8), contrôlant ainsi leur endocytose via AP-2 et/ou leur trafic intracellulaire via les autres APs. A l'exception d'AP-4, qui a été impliqué dans l'adressage basolatéral au TGN dans une seule étude (Simmen et al., 2002), seul AP-1 a jusqu'ici été impliqué dans l'adressage basolatéral.

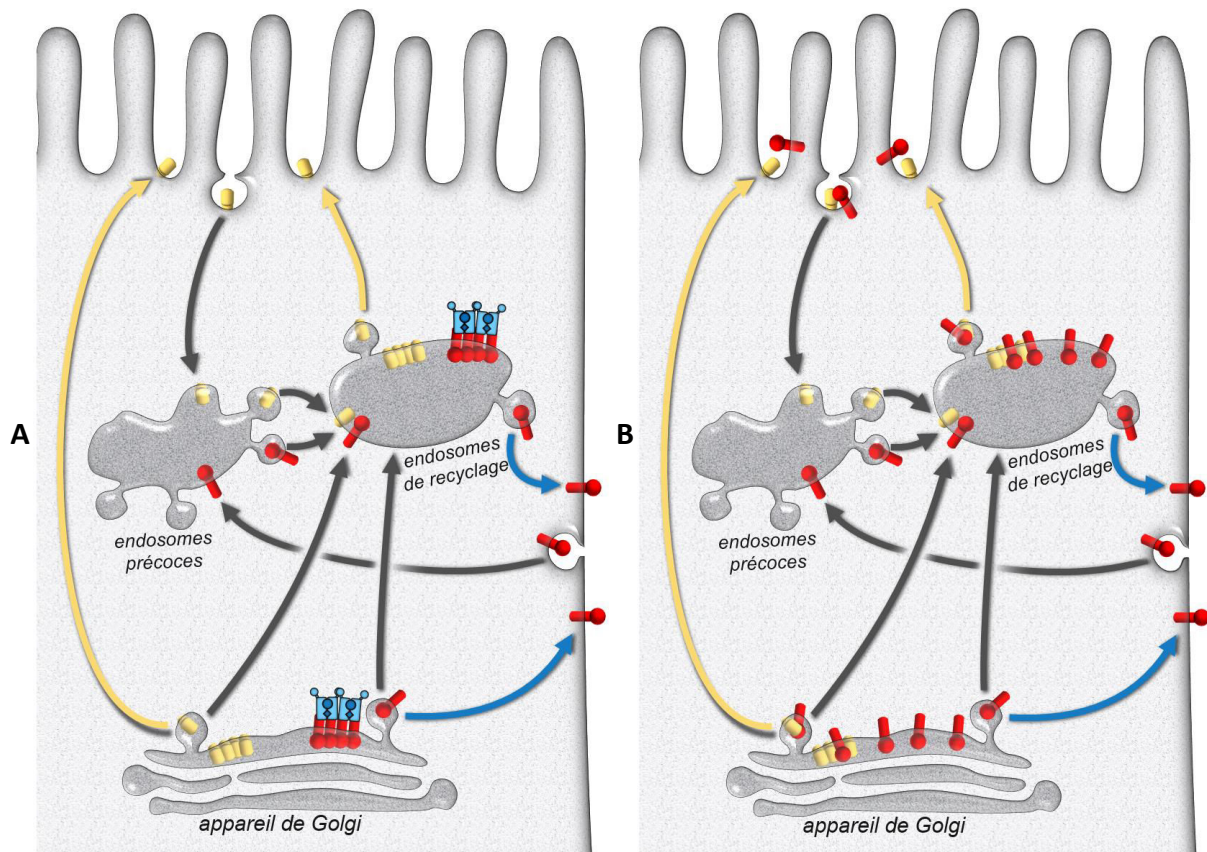
L'intérêt pour AP-1 comme régulateur du tri polarisé dans les épithélia remonte à la découverte en 1999 chez les mammifères d'une nouvelle isoforme de la sous-unité  $\mu 1$ , appelée  $\mu 1B$ , spécifiquement exprimée dans certains épithélia, en plus de l'isoforme  $\mu 1A$  exprimée ubiquitairement (Ohno et al., 1999, Fölsch et al., 1999). L'incorporation de  $\mu 1A$  ou de  $\mu 1B$  dans le complexe AP-1 génère donc deux complexes différents, appelés AP-1A et AP-1B. De manière intéressante, il a été observé que des souris mutantes pour la sous-unité  $\gamma 1$ , affectant tous les complexes AP-1, arrêtaient leur développement beaucoup plus tôt (3,5 jours post-fécondation, sans doute après la fin de la contribution maternelle, Zizioli et al., 1999) que des souris mutantes pour la sous-unité  $\mu 1A$  (13,5 jours post-fécondation, Meyer et al., 2000), suggérant que le complexe AP-1B exprimé dans les épithélia continuait à assurer certaines fonctions en l'absence d'AP-1A. Plusieurs études en cellules en culture dérivées d'épithélia de mammifères ont montré que AP-1A et AP-1B contrôlent le trafic de cargos différents. Par exemple, la lignée LLC-PK1 dérivée d'un épithélium de tubule proximal de rein n'exprime pas

$\mu$ 1B et adresse le récepteur LDLR (Low-Density Lipoprotein Receptor) aussi bien au pôle apical qu'au pôle basolatéral, alors que la lignée MDCK dérivée d'un épithélium de tubule distal de rein exprime  $\mu$ 1B et adresse LDLR uniquement au pôle basolatéral. Remarquablement, l'expression ectopique de  $\mu$ 1B dans les cellules LLC-PK1 suffit à l'adressage de LDLR au pôle basolatéral (Fölsch et al., 1999). Les sous-unités  $\mu$  des complexes APs étant celles reconnaissant les signaux tyrosine (Ohno et al., 1995, Owen & Evans, 1998), il n'est pas étonnant que l'incorporation de  $\mu$ 1A ou B dans le complexe AP-1 lui confère une spécificité de cargos basée sur les signaux tyrosines de ces cargos. C'est le cas pour les récepteurs AGPR-H1 (asialoglycoprotein receptor subunit H1) et la protéine transmembranaire lysosomale Lamp-1, dont l'adressage basolatéral requiert la reconnaissance de leur signal tyrosine par AP-1B. De manière plus surprenante, l'adressage basolatéral de LDLR et TfR dépend aussi de leur reconnaissance par AP-1B mais cette reconnaissance ne passe pas par celle de leur signal tyrosine (Sugimoto et al., 2002). En plus de contrôler différents cargos, AP-1A et AP-1B localisent préférentiellement respectivement au TGN et aux endosomes de recyclage (Fölsch et al., 2001, Fölsch et al., 2003, Gravotta 2007, Fields 2009). A partir de ces observations, AP-1B a été considéré comme le facteur permettant dans les épithélia l'adressage basolatéral de cargos néo-synthétisés ou endocytés à partir des endosomes de recyclage, où il jouerait une fonction de ségrégation latérale de cargos (voir *Tri polarisé, introduction*, page 36, Thompson et al., 2007), alors que le complexe ubiquitaire AP-1A ne contribuerait au tri basolatéral de certains cargos qu'au niveau du TGN dans la voie de biosynthèse. Cette vue a depuis été contredite par les observations suivantes : les souris KO pour  $\mu$ 1B sont viables, suggérant que AP-1A peut compenser la perte de fonction de AP-1B (Takahashi et al., 2011) ; en l'absence d'AP-1A, AP-1B contrôle aussi des événements de tri au TGN dans des cellules MDCK (Gravotta et al., 2012) et le transport rétrograde des MPRs dans des fibroblastes (Eskelinen et al., 2002) ; AP-1A contrôle aussi le tri aux endosomes de recyclage (Delevoye et al., 2009) ; de nouvelles versions taguées de  $\mu$ 1A et B (avec cette fois-ci un tag en C-Terminal et un espaceur, au lieu du tag inséré dans une boucle interne de la protéine utilisé jusque-là) localisent toutes les deux au TGN et aux endosomes de recyclage et colocalisent entre elles (Guo et al., 2013a). Ces observations indiquent que AP-1A et B contrôlent les mêmes événements de tri aux mêmes compartiments mais avec des affinités différentes pour leurs cargos, et que l'expression de  $\mu$ 1B dans certains tissus épithéliaux n'a pour effet que d'élargir le répertoire des cargos reconnus et adressés basolatéralement par AP-1. Ce modèle est lui-même aujourd'hui sujet à débat (Rodriguez-Boulan et al., 2013), des expériences de recyclage montrant que AP-1A ne peut pas substituer la fonction de AP-1B pour le recyclage de LDLR,

bien qu'il contrôle son trafic dans la voie biosynthétique en coopération avec AP-1B (Gravotta et al., 2012). Il faut aussi garder à l'esprit que toutes les données recueillies sur la localisation de AP-1A et B reposent sur des protéines non seulement taguées, mais en plus surexprimées qui pourraient ne pas refléter leur véritable localisation.

Quels que soient les rôles respectifs de  $\mu$ 1A et B, ces études en cellules en culture de mammifères établissent AP-1 comme un régulateur majeur de l'adressage basolatéral. AP-1 fonctionne aux endosomes de recyclage et sans doute de la même manière au TGN pour ségréger les cargos à destination de la membrane basolatérale des cargos à destination de la membrane apicale (Thompson et al., 2007). En l'absence d'AP-1, les cargos à destination de la membrane basolatérale sont aussi incorporés dans des vésicules à destination de la membrane apicale, causant leur localisation à cette membrane.

Ce rôle a été confirmé *in vivo* chez le nématode où il est assuré par l'isoforme de  $\mu$ 1 APM-1 mais pas UNC-101 (Zhang et al., 2012, Shafaq-Zadah et al., 2012), la Drosophile (Benhra et al., 2011), le poisson zèbre (Clemens-Grisham et al., 2013) et la souris (Takahashi et al., 2011; Hase et al., 2013) où la perte de fonction d'AP-1 induit aussi une localisation apicale de protéines normalement basolatérales.



**Figure 17. AP-1 dans le tri épithélial polarisé.** (A) A l'appareil de Golgi et aux endosomes de recyclage, AP-1 ségrège les cargos à destination de la membrane basolatérale (rouge) des cargos à destination de la membrane apicale (jaunes). Les cargos peuvent être adressés directement du TGN à la membrane plasmique appropriée, ou transiter par les endosomes de recyclage. Une fois endocytés, les cargos basolatéraux et apicaux convergent dans les mêmes endosomes précoces puis les mêmes endosomes de recyclage, où ils sont à nouveau triés par AP-1. (B) En l'absence d'AP-1, les cargos basolatéraux ne sont plus ségrégés des cargos apicaux, peuvent donc être intégrés avec eux dans des transporteurs apicaux et ne sont donc plus exclus de la membrane apicale.

### *Tri polarisé AP-1 dépendant en dehors des épithélia*

AP-1 joue un rôle similaire dans les neurones, où il est requis pour l'adressage polarisé de cargos aux dendrites. Ce tri dépend de la reconnaissance de signaux d'adressage dendritique reconnus par AP-1, classiquement formés de séquences consensus Tyrosine et di-Leucine. Dans des neurones de *C. elegans* (Dwyver et al, 2001 ; Bae et al., 2006 ; Sakaguchi-Nakashima et al., 2007 ; Margeta et al., 2009) et de mammifères *ex vivo* (Farías et al., 2012, Foss et al., 2013, Mattera et al., 2014) où la fonction d'AP-1 est affectée, des protéines normalement exclusivement dendritiques sont également retrouvées aux membranes axonales. De la même manière que l'isoforme APM-1 de  $\mu 1$  contrôle l'adressage basolatéral dans les épithélia (Zhang et al., 2012, Shafaq-Zadah et al., 2012), c'est l'isoforme UNC-101 qui est impliqué dans l'adressage dendritique (Bae et al., 2006).

AP-1 est aussi impliqué dans la biogénèse du cil cellulaire, un organite ayant une fonction sensorielle formant une protrusion extracellulaire organisée par un axonème, une structure organisée par le cytosquelette de microtubules et de composition membranaire distincte du reste de la membrane plasmique (Vieira et al., 2006). Ce rôle d'AP-1 semble indépendant de la position du cil dans ces cellules polarisées : dans les neurones de *C. elegans*, il émerge des membranes dendritiques, auxquelles AP-1 contrôle l'adressage polarisé, mais dans les cellules épithéliales de mammifères en culture, il émerge de la membrane apicale, alors qu'AP-1 contrôle l'adressage basolatéral. Dans ces deux modèles, la perte de fonction d'AP-1 induit des défauts de morphologie, de positionnement et d'orientation du cil (Kaplan et al., 2010). Cette fonction d'AP-1 passe au moins chez *C. elegans* par un transport de protéines ciliaires AP-1-dépendant puis Rab8-dépendant (Kaplan et al., 2010). Cette fonction est conservée chez le protozoaire *Leishmania* (voir page 21), où AP-1 est requis pour la formation du flagelle, un organite similaire (voire équivalent) au cil cellulaire.

#### 2.4 Contrôle du trafic membranaire sur la polarité épithéliale.

*Endocytose.* Un contrôle de la polarité épithéliale par l'endocytose n'a pas été établi dans les cellules de mammifère en culture. Dans des cellules MDCK, les défauts de polarité observés après déplétion de la clathrine (Deborde et al., 2008) sont probablement dus à un défaut d'exocytose plutôt que d'endocytose sachant que la déplétion d'AP-2 n'induit pas de défaut de polarité. Il a par contre clairement été établi que l'endocytose régule la polarité épithéliale *in vivo* chez la Drosophile. En effet, la perte de fonction de régulateurs de l'endocytose (AP-2, la syntaxine Avalanche, la petite GTPase des endosomes précoces Rab5, l'effecteur de Rab5 Rabénosyne, Vps45) induit un défaut de polarité apico-basale (Lu & Bilder, 2005, Morrison et al., 2008, Windler et al., 2010). Crumbs étant la seule protéine de polarité transmembranaire, il n'est pas surprenant que l'endocytose régule la polarité en contrôlant localement les niveaux de Crumbs. Il apparaît en effet que l'endocytose de Crumbs est inhibée à la surface apicale via une voie d'auto-stabilisation de Crumbs passant par des interactions homophiliques Crumbs-Crumbs menant au recrutement et à la stabilisation d'autres protéines des complexes apicaux CRB et PAR (Fletcher et al., 2012). Cdc42, une autre protéine de polarité apicale, intervient aussi dans ce mécanisme d'inhibition de l'endocytose de Crumbs (Harris & Tepass, 2008). Ce mécanisme est antagonisé à la membrane basolatérale par Lgl, permettant donc l'endocytose et l'exclusion basolatérale de Crumbs (Fletcher et al., 2012). Il



est à noter que si l'endocytose de Crumbs est dans des conditions normales réduite au pôle apical, elle n'y est pas pour autant complètement abolie et pourrait être nécessaire pour y maintenir un certain niveau, au-delà duquel une accumulation apicale de Crumbs induirait une expansion aberrante du domaine apical (Lu & Bilder, 2005, Morrison et al., 2008, Windler et al., 2010). Il paraît aussi envisageable, si l'adressage polarisé n'est même en conditions normales pas parfaitement fiable, que l'endocytose contribue à corriger des erreurs d'adressage. Enfin, affecter l'endocytose pourrait également affecter la polarité épithéliale en affectant des voies de transcytose.

*Exocytose/recyclage.* Aux étapes précoces de la polarisation de cellules MDCK en culture (mais aussi dans des hépatocytes en culture, Wakabayashi, 2005), les endosomes de recyclage jouent un rôle crucial dans l'établissement de la polarité apico-basale. Après la division d'une cellule MDCK isolée, ils s'accumulent au site de cytokinèse entre les deux cellules filles et sont requis pour l'établissement d'une zone pré-apicale qui mature par la suite en pôle apical (Ferrari et al., 2008). Crumbs est internalisé avant la mitose et est adressé, ainsi que d'autres protéines apicales telles que Gp135, à cette zone pré-apicale via ces endosomes de recyclage (Ferrari et al., 2008, Schlüter et al., 2009). Chez la Drosophile, l'adressage dépendant de l'exocyste (Blankenship, 2007) de Crumbs à la membrane apicale via les endosomes de recyclages (Roeth et al., 2009) est aussi nécessaire au maintien de la polarité épithéliale de l'ectoderme et mène au désassemblage des jonctions s'il est affecté. Une autre voie de recyclage de Crumbs, ne passant pas nécessairement par les endosomes de recyclage mais aussi nécessaire pour la maintenance de la polarité (Pocha et al., 2011), a été découverte chez la Drosophile. Crumbs, après son endocytose, peut être adressé des endosomes précoces aux endosomes tardifs (ainsi que d'autres protéines apicales telles que Notch, Delta, et Cad87A) d'une façon dépendante de Cdc42 (Harris & Tepass, 2008) puis, au lieu d'être ensuite adressé aux lysosomes pour y être dégradé, est adressé par transport rétrograde dépendant du complexe rétromère auTGN (Pocha et al., 2011 ; Zhou et al., 2011), d'où il peut alors être réadressé à la surface cellulaire sans forcément transiter par les endosomes de recyclage. Il a récemment été découvert que Scrb modulait directement, d'une manière encore mal déterminée, l'action du rétromère pour contrôler l'itinéraire de Crumbs dans cette voie (de Vreede et al., 2014). L'importance de cette voie pour la polarité pourrait expliquer les défauts de polarité observés toujours chez la Drosophile dans les mutants du complexe ESCRT contrôlant le tri de cargos aux endosomes tardifs (Thompson et al., 2005, Vaccari & Bilder, 2005).

*AP-1 et maintenance de la polarité épithéliale.* En plus de confirmer le rôle d'AP-1 dans l'adressage basolatéral, les études *in vivo* chez *C. elegans* et les mammifères ont mis en évidence sa fonction dans la maintenance de la polarité épithéliale. En effet, la perte de fonction d'AP-1 dans des cellules intestinales de ces deux modèles induit la formation de pôles apicaux ectopiques à la membrane basolatérale (Zhang et al., 2012, Shafaq-Zadah et al., 2012, Hase et al., 2013), un défaut de localisation de E-Cadhérine et, additionnellement, une délocalisation basolatérale de protéines apicales dont la protéine de polarité Par-6 chez *C. elegans* (Zhang et al., 2012, Shafaq-Zadah et al., 2012) et une absence de microvillosités apicales chez la souris (Hase et al., 2013). La délocalisation de protéines apicales chez *C. elegans* pourrait s'expliquer par une implication directe d'AP-1 dans le tri apical de cargos, mais je propose en discussion (page 93) que ce défaut est conséquence indirecte de la sévère délocalisation que subissent les endosomes de recyclage positifs pour Rab11, eux aussi requis pour la polarité épithéliale (voir page 44) dans ce contexte : le fort enrichissement de ces endosomes au pôle apical est complètement perdu dans les cellules déplétées pour AP-1.

## 2.5 Trafic membranaire de E-Cadhérine

*Plasticité des jonctions d'adhérence et morphogénèse épithéliale.* Les tissus épithéliaux subissent au cours du développement de nombreux mouvements morphogénétiques au cours desquels les cellules épithéliales doivent changer de forme et/ou de voisins, sans que l'épithélium ne perde pour autant son intégrité. Dans des mutants de régulateurs du trafic membranaire, des défauts aux jonctions d'adhérence précisément pendant les mouvements morphogénétiques ont mené à l'idée que cette plasticité de l'adhésion repose sur la modulation d'une endocytose et un recyclage constants d'E-Cad (Le et al., 1999). En effet, affecter l'endocytose ou l'exocytose de E-Cad pendant la transition épithélio-mésenchymateuse des neuroblastes (Harris et Tepass, 2008), pendant la polarisation planaire dans l'aile (Classen et al., 2005), l'intercalation des cellules de la trachée (Shaye et al., 2008) ou de la bande germinale (Levayer et al., 2011) chez la *Drosophile* mène à un aspect anormal de ces jonctions, voire à leur désassemblage, et au déroulement anormal du mouvement morphogénétique. Les effets du contrôle des niveaux d'E-Cad par le trafic sur un mouvement morphogénétique ont particulièrement bien été mis en lumière lors de l'élongation de la trachée chez la *Drosophile*. Dans ce système, certaines branches mais pas d'autres du réseau

de tubes formant la trachée s'allongent par un mécanisme d'intercalation entre cellules. Il a été montré que l'endocytose de E-Cad réduisait la quantité de E-Cad à la surface et permettait l'intercalation, et que l'absence d'intercalation dans certaines cellules venait du fait qu'un compartiment Rab11 enrichi sous le pôle apical permettait un recyclage plus efficace de E-Cad et donc de niveaux plus élevés de E-Cad aux jonctions (Shaye et al., 2008).

*Régulation de l'endocytose de E-Cad.* L'endocytose de E-Cad repose principalement sur une voie dépendante de la clathrine et du complexe AP-2 (Le et al., 1999, Xiao et al., 2005). Chez les mammifères, p120-Caténine inhibe cette voie d'endocytose en masquant sur le domaine cytoplasmique de E-Cad un motif consensus di-Leucine reconnu par AP-2 (Xiao et al., 2005, Chiasson et al., 2009, Nanes et al., 2012). Cette interaction est renforcée par Scrb (Lohia et al., 2012). L'ubiquitination de E-Cad par l'ubiquitine-ligase E3 Hakai aboutit aussi à l'internalisation et la dégradation d'E-Cad, possiblement en inhibant l'interaction entre p120-Cat et E-Cad (Fujita et al., 2002). Chez la Drosophile, p120-Caténine et Hakai n'apparaissent par contre pas comme des régulateurs majeur de l'endocytose d'E-Cad (Pacquelet et al., 2003, Kaido et al., 2009), vraisemblablement parce que le motif Di-Leucine reconnu par AP-2 et masqué par p120-Cat chez les mammifères n'est pas conservé. De manière intéressante, la phosphorylation de  $\beta$ -Cat par C-Abl induit l'endocytose de N-Cad chez les mammifères (Tai et al., 2007) et possiblement de E-Cad chez la Drosophile (Tamada et al., 2012) sans que l'affinité de  $\beta$ -Cat pour les Cads ne soit affectée, soulevant la possibilité que  $\beta$ -Cat serve d'intermédiaire pour l'endocytose d'E-Cad. E-Cad est d'ailleurs internalisée avec d'autres composant de jonctions (Leibfried et al., 2008). La régulation de l'endocytose de E-Cad chez la Drosophile fait aussi intervenir Cdc42 et le cytosquelette d'actine. Selon les contextes cellulaires, Cdc42 peut inhiber ou au contraire permettre l'endocytose de E-Cad. Dans le neurectoderme, Cdc42 est nécessaire pour le maintien des jonctions d'adhérence et sa perte de fonction induit l'endocytose d'E-Cad (Harris et al., 2008), mais ce phénotype n'est vraisemblablement qu'une conséquence indirecte de l'endocytose d'autres protéines apicales comme Crumbs. Au contraire, dans le thorax dorsal (notum) de la Drosophile, la perte de fonction de Cdc42 induit la formation de vésicules endocytiques élargis émanant des jonctions d'adhérence (Leibfried et al., 2008), un phénotype aussi observé dans des mutants pour la Dynamine, une protéine requise pour la scission des vésicules lors du bourgeonnement vésiculaire (Classen et al., 2005). Il a été montré que Cdc42 intervient, avec Par-6 et des protéines contrôlant la polymérisation de l'actine comme Wasp et Arp2/3, son partenaire Cip4 et la dynamine, dans la scission des vésicules lors de l'endocytose d'E-Cad (Leibfried et al., 2008 ; Georgiou et

al.2008). Chez les mammifères, Cdc42 semble plutôt avoir un rôle dans le tri de cargo du trafic au TGN et aux endosomes de recyclage (Erickson et al., 1996, Musch et al., 2001). D'autres régulateurs de la polymérisation de l'actine, Scar et la Formine Diaphanous, ont aussi été impliqués dans l'endocytose de E-Cad dans l'embryon précoce de la Drosophile pendant l'intercalation des cellules de la bande germinale, où il contrôlent l'endocytose locale de E-Cadhérine à des jonctions diminuant de taille (Levayer et al., 2011). Une fois internalisée, E-Cad peut être recyclée (voir paragraphe suivant) ou adressée aux lysosomes pour dégradation. Il a été montré que Scrb intervenait dans cette dernière voie pour empêcher le trafic rétrograde rétromère-dépendant de E-Cad lui faisant éviter la dégradation (Lohia et al, 2012). Enfin, une étude de super-résolution chez la Drosophile a récemment révélé que l'endocytose jouait un rôle majeur dans la limitation de la taille des clusters de E-Cad, mais n'agissait que sur des clusters regroupant au moins une centaine de molécules (Quang et al., 2013).

*Régulation de l'exocytose d'E-Cad.* Le transport de E-Cad via les endosomes de recyclage a été démontré en cellule de mammifère au moins pour la E-Cad nouvellement synthétisée (Lock & Stow 2005 ; Desclozeaux et al. 2008) et chez la Drosophile au moins pour la E-Cad recyclée, où E-Cad est apparemment d'abord adressée à la membrane basolatérale puis suit une voie de transcytose aux jonctions d'adhérence via les endosomes de recyclage (Langevin et al., 2005). E-Cad est observée à la surface apicale dans des cellules MDCK déplétées pour Rab11, indiquant que l'adressage basolatéral et/ou au jonction de E-Cad dans les MDCK fait aussi intervenir les endosomes de recyclage (Desclozeaux et al. 2008). Le transport des endosomes de recyclage aux jonctions d'adhérence fait intervenir le complexe exocyste et  $\beta$ -Cat (Yeaman et al., 2004, Langevin et al., 2005).  $\beta$ -Cat joue chez les mammifères comme chez la Drosophile un rôle prépondérant dans le trafic vésiculaire. Chez les mammifères, une perte de l'interaction entre  $\beta$ -Cat et E-Cad induit l'accumulation endocytose-indépendante de E-Cad au TGN, dans les endosomes de recyclage, et la dégradation de E-Cad par les lysosomes (Miyashita & Ozawa, 2007). Cette interaction entre E-Cad et  $\beta$ -Cat, nécessaire pour le trafic intracellulaire de E-Cad avant qu'elle n'atteigne la surface cellulaire, est positivement régulée par une phosphorylation d'E-Cad à son site de liaison à  $\beta$ -Cat (McEwen et al., 2014). Chez la Drosophile, la perte de fonction de l'exocyste ou la perte de l'interaction entre l'exocyste et  $\beta$ -Cat aux endosomes de recyclage induit l'accumulation de E-Cad dans un compartiment de recyclage élargi (Langevin et al., 2005). Dans les cellules MDCK, une autre protéine, PIPKy1 (type 1  $\gamma$  phosphatidylinositol phosphate kinase), joue aussi le rôle d'adaptateur entre E-Cad et les machineries de trafic vésiculaire. L'adressage basolatéral de E-Cad dépend de sa liaison

à la sous-unité  $\mu 1$  du complexe AP-1B via PIPK $\gamma$ 1 dans les endosomes de recyclage. Il apparaît aussi que la génération de PIP2 par l'activité kinase de PIPK $\gamma$ 1 soit importante dans cette voie de transport (Ling et al., 2007).

L'activité et la localisation du compartiment de recyclage peuvent aussi être modulées par des partenaires de Rab11, tels que la protéine dRip11 lors de l'élongation de la trachée avec un effet sur la quantité de E-Cad recyclée aux jonctions (Shaye et al., 2008).

## Chapitre 3

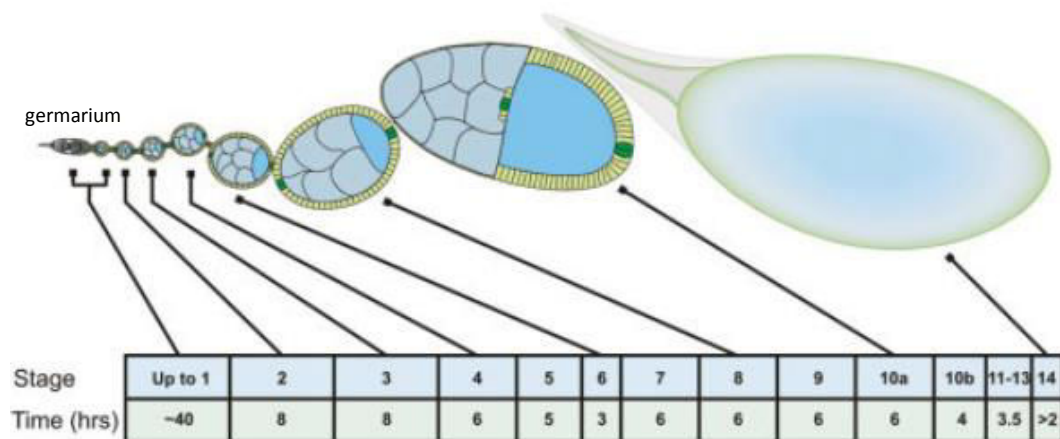
### Ovogénèse chez la Drosophile

Les pertes de polarité épithéliale observées in vivo chez *C. elegans* et les mammifères n'ont pas été reproduites dans le notum de la Drosophile (Benhra et al., 2011). Le notum est un épithélium mature, qui ne subit plus de mouvement morphogénétique drastique, et est peut-être pour cette raison moins sensible à un défaut de trafic intracellulaire (voir *Trafic membranaire de E-Cadhérine* page 43). C'est pour cette raison que nous avons décidé d'étudier le rôle d'AP-1 dans l'ovogénèse de la Drosophile, au cours de laquelle un épithélium folliculaire est assemblé et subit plusieurs mouvements morphogénétiques. Un avantage technique de l'ovogénèse par rapport à l'embryogénèse est sa durée (l'ovogénèse dure 10 jours contre un jour pour l'embryogénèse, et l'épithélium folliculaire est formé en une quarantaine d'heures, contre 40 minutes pour l'ectoderme embryonnaire), permettant d'étudier l'établissement et le maintien de la polarité épithéliale avec une meilleure résolution temporelle. Un autre avantage de taille par rapport à l'embryogénèse est la possibilité de générer des tissus mosaïques (voir page 59).

#### 3.1 Ovaire de la Drosophile

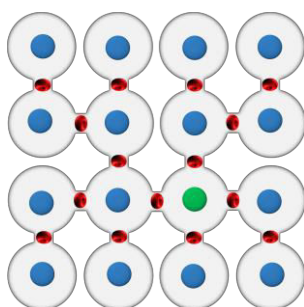
Chacun des deux ovaires de la Drosophile est composé de 14 à 16 ovarioles contenant une suite d'ovocytes à divers stades de développement croissant. Chaque ovocyte est contenu dans une chambre d'œuf, composée d'un épithélium folliculaire enrobant un cyste germinale comprenant 15 cellules nourricières et l'ovocyte. Le cyste germinale et l'épithélium folliculaire ont pour origine des cellules souches situées dans le germarium, une structure située à la partie la plus antérieure de l'ovariole. Les chambres d'œuf sont continuellement assemblées dans le germarium et migrent au cours de leur développement vers le côté postérieur de l'ovariole. Par conséquent, à la manière d'une chaîne d'assemblage, chaque ovariole contient une file de chambres d'œuf à des stades de plus en plus avancés.

### 3.2 Déroulement de l'ovogénèse et mouvements morphogénétiques



**Figure 18.** Schéma d'une ovariole de *Drosophile*. Les chambres d'œuf sont assemblées dans le germarium au côté antérieur de l'ovariole et progressent vers le postérieur au cours de leur maturation. La durée en heures de chaque stade de l'ovogénèse est représentée en bas. Adapté de Horne-Badovinac & Bilder, 2009.

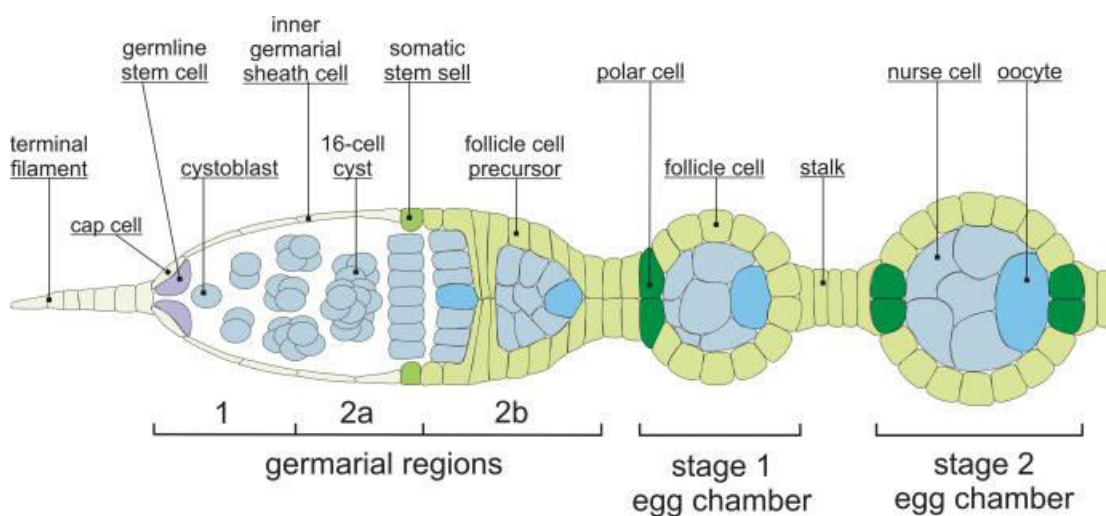
*Assemblage de la chambre d'œuf dans le germarium.* La formation d'une chambre d'œuf dans le germarium débute par la division d'une cellule souche germinale, générant une cellule souche par auto-renouvellement et un cystoblaste. Le cystoblaste subit quatre divisions mitotiques successives accompagnées de cytokinèse incomplète, générant une cyste germinale de 16 cellules interconnectées par des ponts intercellulaires appelés ring canals. Ceux-ci sont formés et stabilisés à partir de ces anneaux de cytokinèse incomplète, et permettent des échanges cytoplasmiques entre cellules. Les détails de leur formation et de leur croissance au cours de l'ovogénèse seront abordés dans le paragraphe suivant. Les divisions du cystoblastes sont orientées de manière à ce que le cyste présente une organisation stéréotypée, avec une position précise des cellules et nombre précis de ring canals par cellule.



**Figure 19.** Organisation stéréotypée du cyste germinale femelle. Parmi ces 16 cellules connectées entre elles par des ring canals (rouge), l'une des deux portant quatre ring canals se différencie en ovocyte (noyau vert).

De ce fait, deux des cellules du cyste portent quatre ring canals et sont positionnées au côté postérieur du cyste. L'une d'entre elles se différencie en ovocyte et maintient sa position postérieure à l'aide de contacts privilégiés médiés par E-Cad aux cellules folliculaires postérieures (Godt & Tepass, 1998). Une fois les quatre divisions du cystoblaste terminées, le cyste a migré à une région médiane du germarium, à proximité de deux cellules souches

folliculaires. C'est à cette étape que le cyste est encapsulé par des cellules folliculaires dérivant de ces cellules souches (voir *Formation de l'épithélium folliculaire* page 34). Parmi ces cellules, en plus des cellules épithéliales entourant toute la chambre d'œuf, des cellules polaires sont spécifiées aux côtés antérieurs et postérieurs du cyste par un signal Delta émis par le cyste activant la voie Notch dans des cellules pré-polaires (Grammont & Irvine 2001). Une fois encapsulée, la chambre d'œuf sort du germarium (une quarantaine d'heures après la division de la cellule souche germinale), étape au cours de laquelle les cellules polaires spécifient à leur tour une rangée de cellules tiges (stalk cells) au côté antérieur de la chambre d'œuf, séparant donc cette chambre des futures chambres d'œuf assemblées au germarium.



**Figure 20.** Assemblage de la chambre d'œuf dans le germarium (voir texte). Adapté de Horne-Badovinac & Bilder, 2009.

*Croissance du tissu.* La chambre d'œuf grandit ensuite continuellement jusqu'à la fin de l'ovogénèse. Dans l'épithélium folliculaire, cette croissance s'accompagne d'une prolifération cellulaire pendant une trentaine d'heure, jusqu'à atteindre environ 650 cellules folliculaires, qui s'arrête en réponse à une signalisation Delta du cyste germinale activant la voie Notch dans l'épithélium (Lopez-Schier & St Johnston, 2001). Après cette prolifération cellulaire, la croissance du tissu est assurée par une endoréplication des cellules folliculaires, c'est-à-dire une réplication de leur matériel génétique sans division cellulaire. Dans le cyste germinale, les cellules nourricières ne subissent aucune division cellulaire –et restent donc au nombre de 15– et adoptent aussi un programme d'endoréplication, alors que l'ovocyte reste en prophase I jusqu'à la fin de l'ovogénèse. La polyploïdie des cellules nourricières leur permet une synthèse soutenue d'ARN et de protéines permettant leur croissance et celle, via les ring canals, de l'ovocyte transcriptionnellement inactif. La vitellogénèse commence à partir de 36 heures après la sortie du germarium (stade 8), et l'accumulation de vitellus par l'ovocyte accélère sa



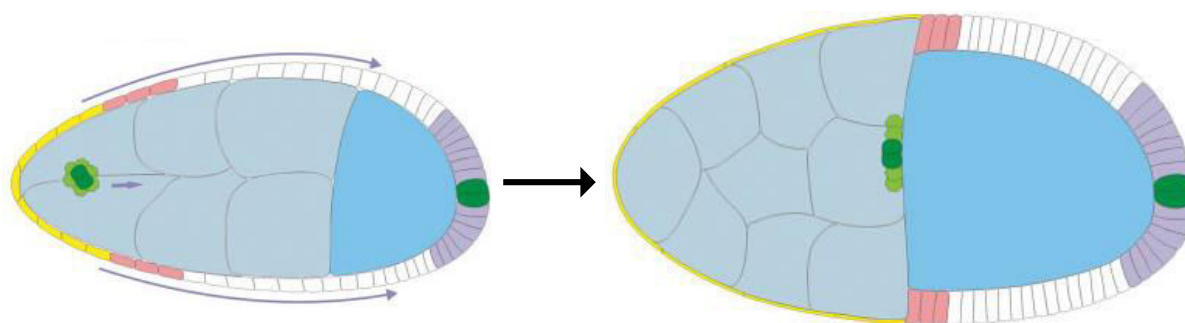
croissance par rapport à celle des autres cellules nourricières. L'ovocyte finit par occuper la moitié du volume de la chambre d'œuf. A la fin de l'ovogénèse, environ 60 heures après la sortie du germarium (stade 11), les cellules nourricières se contractent pour déverser l'ensemble de leur contenu cytoplasmique dans l'ovocyte via les ring canals. Juste avant ce déversement, des cables d'actines émanant de la membrane plasmique sont assemblés jusqu'aux noyaux pour les maintenir en place. En l'absence de ces câbles, les noyaux sont entraînés par le flux cytoplasmique généré par le déversement et bouchent les ring canals (Cooley et al., 1992). E-Cad a récemment été impliquée dans ce processus comme étant nécessaire pour l'orientation perpendiculaire à la membrane plasmique de ces câbles d'actine (Huelsmann et al., 2013).

*Elongation et rotation globale du tissu.* En plus de croître, la chambre d'œuf, originellement à peu près sphérique, s'allonge le long de son axe antéro-postérieur. Le mécanisme contrôlant cet allongement fait intervenir un mouvement morphogénétique récemment découvert, insoupçonné jusqu'à l'amélioration des conditions de culture *ex vivo* des chambres d'œuf : l'ensemble de la chambre d'œuf (l'épithélium folliculaire et le cyste germinale, sans échanges de voisins) tourne sur lui-même pendant environ 24 heures, rotation qui coïncide temporellement avec la phase d'allongement. Cette rotation fait intervenir une migration polarisée planairement des cellules folliculaires le long de la matrice extracellulaire entourant la chambre d'œuf qu'elles contactent via leur face basale, et a pour effet de « coiffer » les fibres de collagène de cette matrice extracellulaire. La conséquence de ce coiffage est une résistance anisotrope de la matrice extracellulaire à la croissance : il est plus facile de croître le long de l'axe antéro-postérieur, aux « pôles » de la chambre d'œuf, plutôt qu'à son « équateur » (Haigo & Bilder., 2011).

*Migration postérieure des cellules folliculaires.* La rotation de la chambre d'œuf fait place à un autre mouvement morphogénétique : environ 40 heures après la sortie du germarium (stade 9), les cellules folliculaires migrent vers le côté postérieur de la chambre d'œuf, jusqu'à ce qu'une majorité des cellules folliculaires contactent l'ovocyte (qui occupe à la fin de la migration environ la moitié de la chambre) et que seulement une cinquantaine d'entre elles restent au contact des cellules nourricières en antérieur. Cette migration s'accompagne d'un changement de morphologie des cellules folliculaires, à l'origine cubiques : celles au contact de l'ovocyte deviennent palissadiques et celles au contact des cellules nourricières squameuses. Là encore, l'activation de la voie Notch intervient, cette fois-ci dans le

désassemblage des jonctions nécessaire à l'étalement des cellules squameuses (Grammont, 2007). Les cellules folliculaires entourant l'ovocyte sécrètent plus tard dans l'ovogénèse les protéines de la coquille de l'œuf.

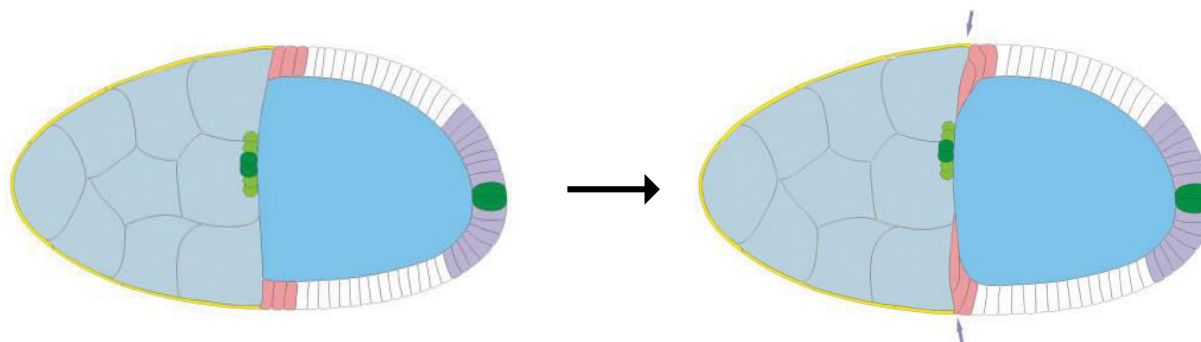
*Migration des cellules de bordures.* En même temps que s'initie la migration des cellules folliculaires, les cellules polaires antérieures recrutent de 4 à 8 cellules épithéliales qui adoptent une identité de cellules de bordure, subissent une transition épithélio-mésenchymateuse, entourent les cellules polaires et migrent collectivement à travers le cyste germinale entre les cellules nourricières jusqu'à l'ovocyte, où elles serviront plus tard de point d'entrée pour le spermatozoïde. Cette migration est guidée par chimotaxie via les ligands PVF et Grk émis par l'ovocyte et les récepteurs PVFR et EGFR des cellules de bordure (Duchek et al., 2001). E-Cad (dont, contrairement à une transition épithélio-mésenchymateuse « habituelle », les niveaux augmentent au cours de ce processus, (Niewiadomska et al., 1999)) est requise aussi bien dans les cellules de bordure que dans les cellules nourricières pour la migration (Niewiadomska et al., 1999, Fulga and Rørth, 2002). Les cellules de bordure migrent en émettant des protrusions entre les cellules nourricières. Une étude récente montre que E-Cad est requise dans les cellules de bordure pour assurer un mouvement unidirectionnel en empêchant l'émission de protrusions des côtés et de l'arrière du groupe de cellules en migration, en transduisant mécaniquement de cellule en cellule, via le cytosquelette d'actine, la traction exercée par les cellules à l'avant du groupe (Cai et al., 2014).



**Figure 21.** Migration postérieure des cellules folliculaires (en jaune, rose et blanc) à la périphérie et des cellules de bordure (vert pâle) à travers les cellules nourricières (bleu pâle) jusqu'à l'ovocyte (bleu foncé) (voir texte). Adapté de Horne-Badovinac & Bilder, 2009.

*Migration centripète des cellules folliculaires.* Environ 6 heures après la fin de la migration postérieure des cellules folliculaires et des cellules de bordure (stade 10b), certaines cellules folliculaires migrent à nouveau pour s'intercaler entre les cellules nourricières et l'ovocyte. Malgré le fait qu'il s'agisse comme pour les cellules de bordure d'une migration entre les

cellules du cyste germinale, la migration centripète en est fondamentalement différente : dans ce cas les cellules ne perdent pas leur identité épithéliale et migrent plutôt par élancement de leur domaine apical.



**Figure 22.** Migration centripète (voir texte). Adapté de Horne-Badovinac & Bilder, 2009.

### 3.3 Ring canals

Les ponts intercellulaires sont des structures interconnectant plusieurs cellules entre elles, stabilisées à l'issue de cytokinèse avortée et observées aussi bien chez les plantes que chez les champignons et les métazoaires. Ils sont présents au moins chez les invertébrés dans les tissus somatiques (où ils ont récemment été impliqués, comme dans les tissus germinaux, dans le transport intercellulaire, Airoidi et al., 2011), et chez les vertébrés comme les invertébrés dans les cellules germinales où ils sont appelés ring canals et où ils présentent une organisation comparable (voir Haglund et al., 2011 pour revue).

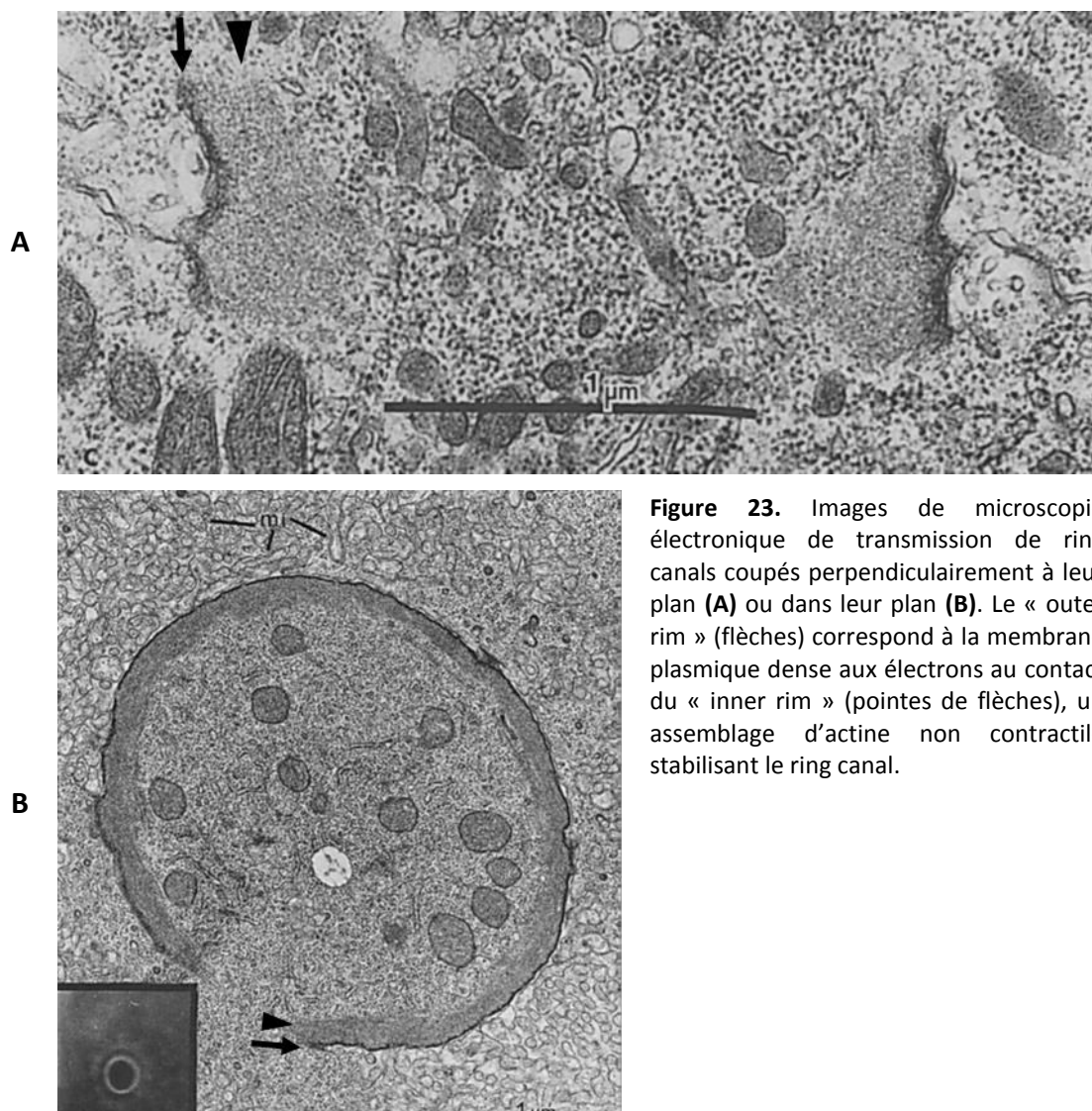
Comme décrit précédemment, les ring canals sont assemblés à l'issue de cytokinèses avortées dans le germarium et permettent les échanges cytoplasmiques entre cellules du cyste pendant toute l'ovogénèse, jusqu'au déversement complet du contenu des cellules nourricières dans l'ovocyte. Ces structures ne sont pas seulement stabilisées, mais en plus dynamiquement régulées pour permettre leur croissance en conjonction avec celle de la chambre d'œuf.

*Cytokinèse incomplète et assemblage du ring canal dans la lignée germinale femelle.* Lors de la cytokinèse, un anneau d'actomyosine connecté à la membrane plasmique se contracte pour invaginer cette membrane. Après la contraction maximale de l'anneau, une cytokinèse complète se termine par une étape d'abscission séparant complètement les deux cellules filles. Lors d'une cytokinèse incomplète dans la lignée germinale de la *Drosophile*, l'anneau

contractile contient initialement des protéines intervenant classiquement dans la cytokinèse, telles qu'un réseau d'actine contractile (Robinson et al., 1997), l'anilline (Field & Alberts, 1995), et Pavarotti (Straight et al., 2005). Deux autres protéines non identifiées spécifiques des ring canals et reconnues l'une par un anticorps dirigé contre des phosphotyrosine (Robinson et al., 1994), l'autre par un anticorps dirigé contre une glycoprotéine sécrétée (Kramerova & Kramarov, 1999), sont aussi recrutées pendant la cytokinèse. La contraction finale de l'anneau est inhibée par des phosphatases de la myosine pour s'arrêter à un diamètre de 0,5µm (Ong et al., 2010, Yamamoto et al., 2013), après quoi l'anilline, Pavarotti et la protéine reconnue par l'anticorps anti-phosphotyrosine assemblent entre la membrane plasmique et l'anneau d'actine une structure dense aux électrons en microscopie électronique appelée outer rim. Le réseau contractile d'actine est ensuite remplacé par un dense réseau d'actine non contractile appelé inner rim (Warn et al., 1985) assemblé par la filamine Cheerio (Robinson et al., 1997) et l'aduccine Hu-li tai shao (Hts, Robinson et al., 1994). Enfin, l'anilline disparaît du ring canal et la protéine Kelch, un régulateur clé de la stabilisation et la croissance des ring canals, est recrutée. De manière intéressante, E-Cad, Par-3 et aPKC localisent pendant l'assemblage des ring canals à la membrane plasmique les entourant dans des structures décrites comme des « ceintures », dont la fonction n'a pas encore été élucidée (Huynh et al. 2001, Cox et al., 2001). Ces résultats évoquent la possibilité intéressante que des jonctions d'adhérence particulières soient mises en place par Par-3 autour des ring canals, d'une manière analogue à l'organisation de la zonula adherens par Par-3 dans les cellules épithéliales.

*Croissance des ring canals.* Le diamètre d'un ring canal évolue de 0,5 à 10 µm pendant l'ovogénèse. Cette croissance, qui requiert l'ajout progressif de filaments d'actine à l'inner rim, a été étudiée en détail par microscopie électronique (Tilney et al., 1996). L'inner rim atteint rapidement (24 heures après la sortie du germarium, stade 5) son épaisseur maximale de 0,35µm alors que la longueur et le diamètre du ring canal augmentent constamment, avec une phase de croissance très accélérée environ 35 heures après la sortie (stade 7), sans que la densité des filaments d'actine n'évolue. Kelch intervient à la fois dans la stabilisation de l'actine à l'inner rim et son remodelage nécessaire à l'expansion de son diamètre. Kelch fonctionne d'une part en interconnectant les uns aux autres les filaments d'actine à partir du stade 5 (Tilney et al., 1996, Kelso et al., 2002). Cette fonction d'interconnexion est inhibée par les kinase Src64 et Tec29, sans doute localement à la face cytoplasmique de l'inner rim devant être désassemblée pour la croissance (Kelso et al., 2002). Kelch a aussi une fonction

supplémentaire, indépendante de l'interconnexion des filaments d'actines, dans le remodelage de l'inner rim. Cette fonction passe par une voie ubiquitine-dépendante faisant intervenir le récepteur à l'ubiquitine Rings lost (Morawe et al., 2011) et l'ubiquitine E3 ligase Cullin-3 avec laquelle Kelch interagit physiquement (Hudson et al., 2013), qui pourrait vraisemblablement impliquer une ubiquitination et par conséquent un adressage au protéasome de protéines stabilisant l'inner rim du ring canal, là encore à sa face cytoplasmique.



**Figure 23.** Images de microscopie électronique de transmission de ring canals coupés perpendiculairement à leur plan (A) ou dans leur plan (B). Le « outer rim » (flèches) correspond à la membrane plasmique dense aux électrons au contact du « inner rim » (pointes de flèches), un assemblage d'actine non contractile stabilisant le ring canal.

*Stabilité des ring canals et trafic membranaire.* Il n'est pas surprenant que des gènes régulateurs de l'actine aient été identifiés dans des cribles génétiques à la recherche de régulateurs de la formation, la maintenance et la croissance et des ring canals. C'est le cas de l'Adducine Hu-li tai shao (Hts) (Robinson et al., 1994; Yue and Spradling, 1992), la Filamine

Cheerio (Sokol and Cooley, 1999), l'Anilline (Field and Alberts, 1995) et Kelch (Kelso et al., 2002; Robinson et al., 1994). Ces cribles n'ont par contre pas apporté de réponse quant à la façon dont les ring canals sont ancrés à la membrane plasmique.

L'analyse de mutants PKA (Protein Kinase A, Lane & Kalderon, 2005) et Akap200 (A-kinase anchoring protein, Jackson & Berg, 2002) dans lesquels les cellules du cystes présentent un phénotype de multinucléation suggère que cette multinucléation peut être due à un décrochage des ring canals de la membrane plasmique. De manière intéressante, plusieurs mutants de régulateurs du trafic membranaire présentent aussi un phénotype non expliqué de multinucléation (complexe Exocyste : Murthy et al., 2005; Murthy & Schwarz, 2004 ; Rab6 : (Coutelis & Ephrussi, 2007; Januschke et al., 2007 ; complexe ESCRT : Vaccari et al., 2009 ; Rab11 : Bogard & Cohen, 2007). Ces observations soulèvent la possibilité que certaines voies du trafic intracellulaire contrôlent l'adressage d'une protéine transmembranaire ou sécrétée nécessaire à l'ancrage des ring canals.

Deuxième partie

## **Objectifs et résultats**

## Objectifs du travail de thèse

Les cellules épithéliales sont polarisées : leur surface est divisée en un pôle apical et un pôle basolatéral de constitutions protéique et lipidique différentes, séparées par une ceinture de jonctions intercellulaires. L'établissement et le maintien de cette polarité apico-basale est assurée par un réseau de protéines contrôlant des mécanismes de tri polarisé aux membranes internes de la cellule. Ce tri permet d'adresser via le trafic vésiculaire des protéines et lipides appropriés au pôle approprié.

L'objectif initial de cette thèse est d'étudier chez *D. melanogaster* le rôle d'AP-1, un complexe protéique contrôlant certains aspects du tri polarisé. En plus de délocaliser au pôle apical des protéines normalement basolatérales, la perte de fonction d'AP-1 s'accompagne dans l'intestin du nématode *C. elegans* (Shafa-Zadah et al., 2012, Zhang et al., 2012) et la souris (Hase et al., 2013) d'un défaut de maintenance de la polarité apico-basale. Chez *D. melanogaster*, des données précédentes de mon laboratoire ont montré que, bien que les défauts d'adressage basolatéral des mutants AP-1 soient bien reproduits dans le notum, un épithélium mature du thorax dorsal, ce tissu conserve sa polarité (Behnra et al., 2011). Ces données indiquent aussi que, contrairement à ce qui a été observé chez les mammifères, ce tissu ne présente pas de défaut de localisation de E-Cad, une protéine transmembranaire localisée à la ceinture jonctionnelle séparant les deux pôles.

Cette dernière observation se base sur la localisation de E-Cad à l'équilibre, en tissu fixé. Ce résultat n'exclut pas strictement un défaut de trafic d'E-Cad : une exocytose réduite pourrait par exemple être compensée par une endocytose elle aussi réduite. J'ai investigué cette possibilité en tirant partie d'un nouvel outil génétique, un allèle knock-in de E-Cad fusionné à la GFP, permettant de visualiser la dynamique d'une E-Cad fonctionnelle et exprimée à un niveau endogène.

Le notum est un épithélium mature, ne subissant plus au stade développemental où nous pouvons l'étudier de réorganisation majeure et pourrait pour cette raison ne pas être sensible à la perte de fonction d'AP-1. C'est pourquoi J'ai investigué sa fonction dans l'épithélium folliculaire, un épithélium enveloppant un cyste germinale de 16 cellules au cours de l'ovogénèse. Cet épithélium subit plusieurs mouvements morphogénétiques et permet de plus d'étudier la mise en place de sa polarité.



Au cours de ces expériences sur l'épithélium folliculaire, j'ai aussi induit des pertes de fonction d'AP-1 dans le cyste germinale. Ce cyste est composé de 15 cellules nourricières et d'un ovocyte. Ces cellules sont connectées entre elles par des ring canals, des ponts cytoplasmiques permettant les échanges entre elles. J'ai observé que les cellules nourricières mutantes pour AP-1 présentent un défaut de stabilité de membrane et ai par la suite investigué ce phénotype déjà décrit mais jamais vraiment expliqué pour plusieurs autres régulateurs du trafic intracellulaire.

## Outils et méthodologies

### 1. Outil génétiques

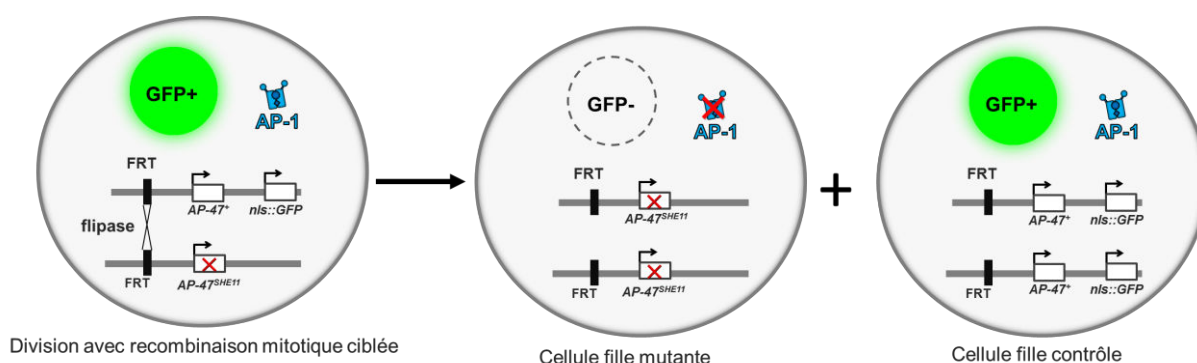
#### *Allèles mutants AP-1.*

L'allèle mutant de l'isoforme  $\mu 1$  *AP-47<sup>SHE11</sup>* résulte d'une délétion de 37 nucléotides causant la délétion des acides aminés 146 à 158 (sur 426) et un décalage du cadre de lecture (communication personnelle de A. Parks à Flybase) et est considéré comme un mutant null, le signal AP-1 $\gamma$  disparaissant dans les clones *AP-47<sup>SHE11</sup>* dans les notum (Benhra et al., 2011).

L'allèle mutant *AP-1 $\gamma^B$*  résulte d'une substitution de nucléotide causant l'apparition d'un codant stop prématuré interrompant la traduction à l'acide aminé 288 sur 960, la létalité induite par cette mutation est complètement sauvée par l'expression d'une forme sauvage de  $\gamma$  (communication personnelle avec H. Bellen et S. Yamamoto) et la protéine potentiellement codée par cet allèle n'est plus reconnue par un anticorps polyclonal dirigé contre son oreille (mes données).

*Analyse clonale en tissu mosaïque.* L'analyse clonale permet d'analyser la fonction de gènes essentiels en induisant dans un tissu initialement sauvage des clones de cellules mutantes. Ces clones sont générés par des recombinaisons mitotiques forcées entre deux chromosomes homologues, l'un portant un allèle sauvage du gène, l'autre portant un allèle muté. Une des cellules filles résultant de cette division et les cellules issues de ses futures divisions portent deux copies de l'allèle mutant et peuvent être identifiées par la perte d'un marqueur clonal comme GFP. Les recombinaisons sont ciblées et forcées à l'aide du système Flp/FRT (flipase/flippase recognition target). L'expression de la flipase, contrôlée par un promoteur tissu-spécifique ou un promoteur de protéine chaperonne activé par un choc thermique, permet la

recombinaison mitotique entre deux sites FRT situés à la même position sur deux chromosomes homologues. Je me suis servi de ce système pour générer des clones mutants pour  $\mu 1$ ,  $\gamma$  et E-Cad. J'ai induit l'expression de la flipase sous le contrôle d'un promoteur de protéine chaperonne avec deux chocs thermiques de 30 minutes, un au stade L2 et un au stade L3 pour induire des clones dans le notum, et avec deux chocs thermiques de 1h à 1h30, un au stades L2 et un au stade L3 pour induire des clones dans l'épithélium folliculaire et le cyste germinal.

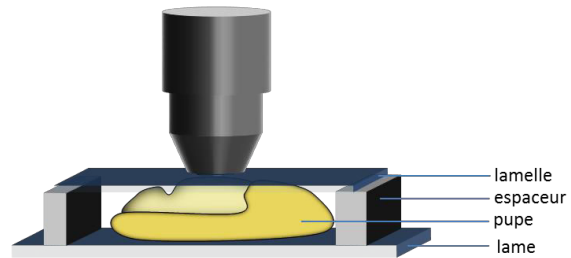


**Figure 24.** La recombinaison mitotique ciblée entre deux sites FRT de chromosomes homologues génère une cellule fille mutante détectable par la perte du marqueur clonal *nls::GFP*.

**Système UAS-GAL4.** Cet outil génétique mettant en jeu la séquence d'activation UAS (Upstream Activation Sequence) et le facteur de transcription GAL4 de *S. cerevisiae* permet l'expression tissu-spécifique de transgènes. Il s'agit d'un système très simple et rapide à appliquer : il suffit de croiser une Drosophile portant un transgène codant GAL4 sous le contrôle d'un promoteur donné avec une Drosophile portant un transgène sous le contrôle de la séquence UAS pour que la génération suivante exprime ce dernier transgène dans les tissus exprimant GAL4. Des milliers de lignées UAS et GAL4 sont disponibles (au Bloomington Drosophila Stock Center et au Kyoto Drosophila Genetic Resource Center), en faisant un système extrêmement modulaire particulièrement bien adapté aux cribles génétiques par RNAi. Au cours de cette thèse, je me suis servi de la lignée MTD-GAL4 (Maternal Triple Driver) portant trois transgènes exprimant GAL4 dans le cyste germinal femelle pour y induire le RNAi contre E-Cad et N-Cad et pour y surexprimer une forme dominante-négative de Rab11.

## 2. Microscopie de fluorescence

*Microscopie non-invasive en temps réel.* Un avantage du notum par rapport à beaucoup d'autres tissus classiquement étudiés chez la *Drosophile* est d'être situé à la surface de l'organisme au stade pupal, où celui-ci est complètement immobile. Ceci permet d'imager très aisément, en temps réel et de manière non-invasive ce tissu avec un microscope confocal classique, d'environ 14h après la formation de la pupa à l'éclosion 4 ou 5 jours plus tard.



**Figure 25.** Montage pour l'imagerie du notum en temps réel.

*Microscopie en temps réel de chambre d'œufs en culture.* L'imagerie en temps réel de chambre d'œuf nécessite de les extraire de l'abdomen d'une *Drosophile* adulte et de les maintenir en vie le temps de l'observation. J'ai pu suivre le développement des chambres d'œufs en culture pendant une dizaine d'heures avant que le tissu ne dégénère (en suivant un protocole publié par Prasad et al., 2009). Au cours de ces expériences, la croissance du tissu et le déroulement normal de mouvements morphogénétiques tels que des migrations de cellules permettent de s'assurer de la viabilité des chambres d'œuf.

*Allèle Knock-in E-Cad::GFP.* J'ai utilisé un allèle Knock-in de E-Cad fusionné à la GFP pour les expériences de FRAP dans le notum et d'imagerie de chambre d'œuf en culture en temps réel. Cet allèle est exprimé à des niveaux endogènes, est viable à l'état homozygote (donc en l'absence de E-Cad non taguée) et est donc considéré comme fonctionnel (Huang et al., 2009).

*FRAP.* Les analyses de FRAP (Fluorescent Recovery After Photobleaching) consistent à photo-blanchir une zone de la cellule où localise une protéine fluorescente et à y mesurer la dynamique du recouvrement de fluorescence causé par l'arrivée de protéines initialement hors de la zone photo-blanchie (donc encore fluorescentes) dans cette zone. J'ai analysé (en collaboration avec Sylvain Bertho pendant son stage de master 2) de cette manière la dynamique de E-Cad::GFP dans des tissus mosaïques pour AP-47<sup>SHE11</sup> où les cellules mutantes étaient repérées par la perte d'un marqueur clonal RFP. Cette analyse a été menée avec le logiciel ImageJ. Trois plans confocaux sur une épaisseur d'1,5µm ont été superposés en une

projection maximale pour pallier à la légère dérive verticale du tissu et la dérive latérale a été corrigée manuellement pour chaque zone photo-blanchie à l'aide d'une macro que j'ai écrite sur ImageJ. Enfin, la moyenne d'intensité de pixels est mesurée pour chaque région photoblanchie et pour l'ensemble de la zone d'acquisition, en excluant de cette zone les régions photo-blanchies. La normalisation et le calcul du pourcentage de recouvrement sont effectués sur le tableur Excel. Le bruit de fond de l'image est évalué par mesure du modal (valeur du pixel le plus représenté) et soustrait de chaque mesure d'intensité de signal. Le pourcentage de perte de signal due au photo-blanchiment de l'ensemble du tissu permet ensuite le calcul d'un facteur de correction du photo-blanchiment qui est appliqué à la mesure du signal dans les zones photo-blanchies. Un pourcentage de recouvrement de 100% est défini par rapport à la moyenne de l'intensité mesurée aux deux derniers temps avant le photo-blanchiment. Un pourcentage de recouvrement de 0% est défini par l'intensité dans la zone photo-blanchie initiale. Selon les expériences, toutes les acquisitions n'ont pas été réalisées avec le même intervalle de temps. Afin de comparer toutes les mesures d'intensité entre elles, la valeur du recouvrement toutes les 30 secondes pendant 30 minutes est calculée pour chaque région photo-blanchie par interpolation linéaire entre les mesures encadrant ces temps.

## Résultats non inclus dans l'article

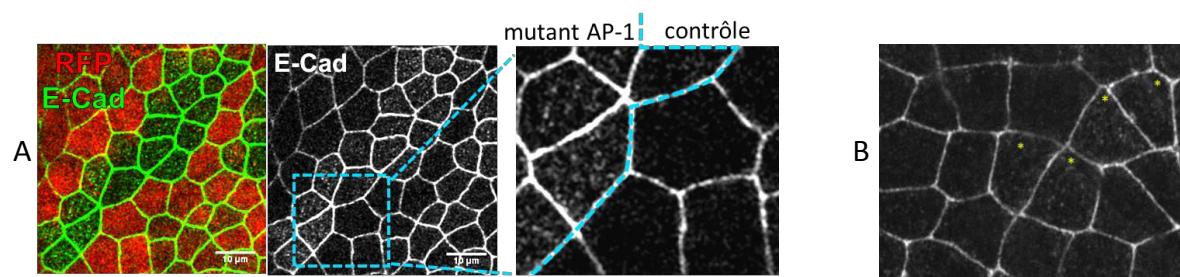
Ces résultats n'ont pas été inclus dans mon papier en premier auteur, qui se focalise uniquement sur la fonction d'AP-1 dans le cyste germinale femelle. Certains d'entre eux feront l'objet d'une publication future sur le rôle d'AP-1 et Crumbs dans la polarité épithéliale dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire d'Ulrich Tepass.

### Trafic AP1-dépendant d'E-Cad dans le notum.

*Les résultats présentés dans cette partie ont été obtenus en collaboration avec Sylvain Bertho que j'ai co-encadré pendant son stage de Master 2 au laboratoire.*

#### 1. Localisation d'E-Cad à l'équilibre

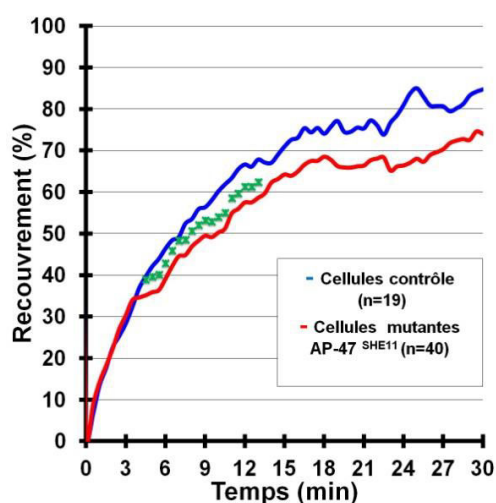
Afin d'étudier la dynamique d'E-Cad par analyse de FRAP, nous avons induit des clones *AP-47<sup>SH<sup>EE</sup>11</sup>* dans des notums exprimant E-Cad::GFP. De manière surprenante, nous avons observé un défaut de localisation de E-Cad dans les cellules mutantes, contrairement aux résultats reportés précédemment (Benhra et al., 2011) : E-Cad::GFP est présente à des structures ponctuelles au pôle apical des cellules mutantes (Fig. 26A, n=142/178 cellules), une délocalisation apicale consistante avec le rôle établi d'AP-1 dans le tri basolatéral. Le fait que ces structures ponctuelles soient statiques (sur une dizaine de minutes) suggère qu'il ne s'agit pas de compartiments intracellulaires mais plutôt de clusters d'E-Cad à la membrane apicale. J'ai également observé ce défaut, bien que moins prononcé et moins fréquemment (ce qui expliquerait qu'il n'ait pas été observé dans Benhra et al., 2011) en immuno-marquant E-Cad endogène en tissu fixé (Fig. 26B n=6/12 cellules dans deux notums). Cette différence pourrait s'expliquer simplement par un artefact généré au cours de l'immunomarquage (par la fixation ou la perméabilisation) mais pourrait éventuellement refléter une sensibilité différente de E-Cad::GFP à la perte de fonction d'AP-1 en raison de l'emplacement de son tag GFP, qui pourrait perturber son trafic intracellulaire. Cette possibilité n'a pas été investiguée de façon plus poussée.



**Figure 26.** Délocalisation apicale d'E-Cad::GFP (A) et d'E-Cad endogène (B) dans les cellules épithéliales du notum mutantes pour AP-1 (cellules perdant le marqueur nls::RFP (rouge) dans A et avec une astérisque jaune dans B).

## 2. Dynamique d'E-Cad

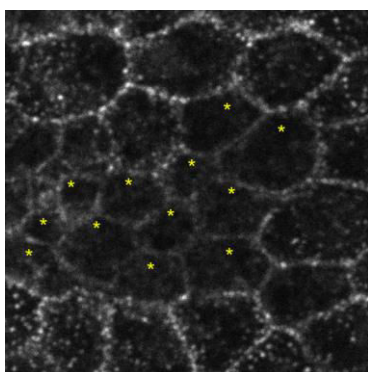
Nous avons par la suite cherché à déterminer par analyse de FRAP si la dynamique d'E-Cad aux jonctions d'adhérences était affectée dans les mutants AP-1 en comparant la vitesse de recouvrement du signal E-Cad::GFP au niveau de la ceinture de jonctions séparant des cellules mutantes et des cellules contrôles. Ce recouvrement est légèrement (de 5 à 10%) plus lent dans les jonctions entre cellules mutantes (Fig. 27), consistant avec un défaut dans la voie biosynthétique et/ou de recyclage d'adressage à la membrane plasmique contrôlée par AP-1.



**Figure 27.** Vitesse de recouvrement du signal E-Cad-GFP aux jonctions d'adhérence entre cellules contrôle (bleu) et mutantes pour AP-1 (rouge) après photoblanchiment. Le recouvrement est significativement (aux temps marqués par des croix vertes) plus lent dans les mutants AP-1.

## 3. AP-2

Au cours de ces travaux, nous avons aussi étudié la fonction d'AP-2 sur le trafic d'E-Cad. Les cellules des clones mutants pour la sous-unité  $\mu 2$  d'AP-2 montrent des niveaux plus élevés d'E-Cad à la membrane plasmique (non montré), consistants avec le rôle bien établi d'AP-2 dans l'endocytose. De manière intéressante, nous avons observé que bien qu'à des niveaux réduits, la sous-unité  $\alpha$  d'AP-2 continue à localiser la membrane plasmique en l'absence de  $\mu 2$  (n=1, figure 28) suggérant l'existence d'un hémicomplexe fonctionnel d'AP-2 (voir page 93).



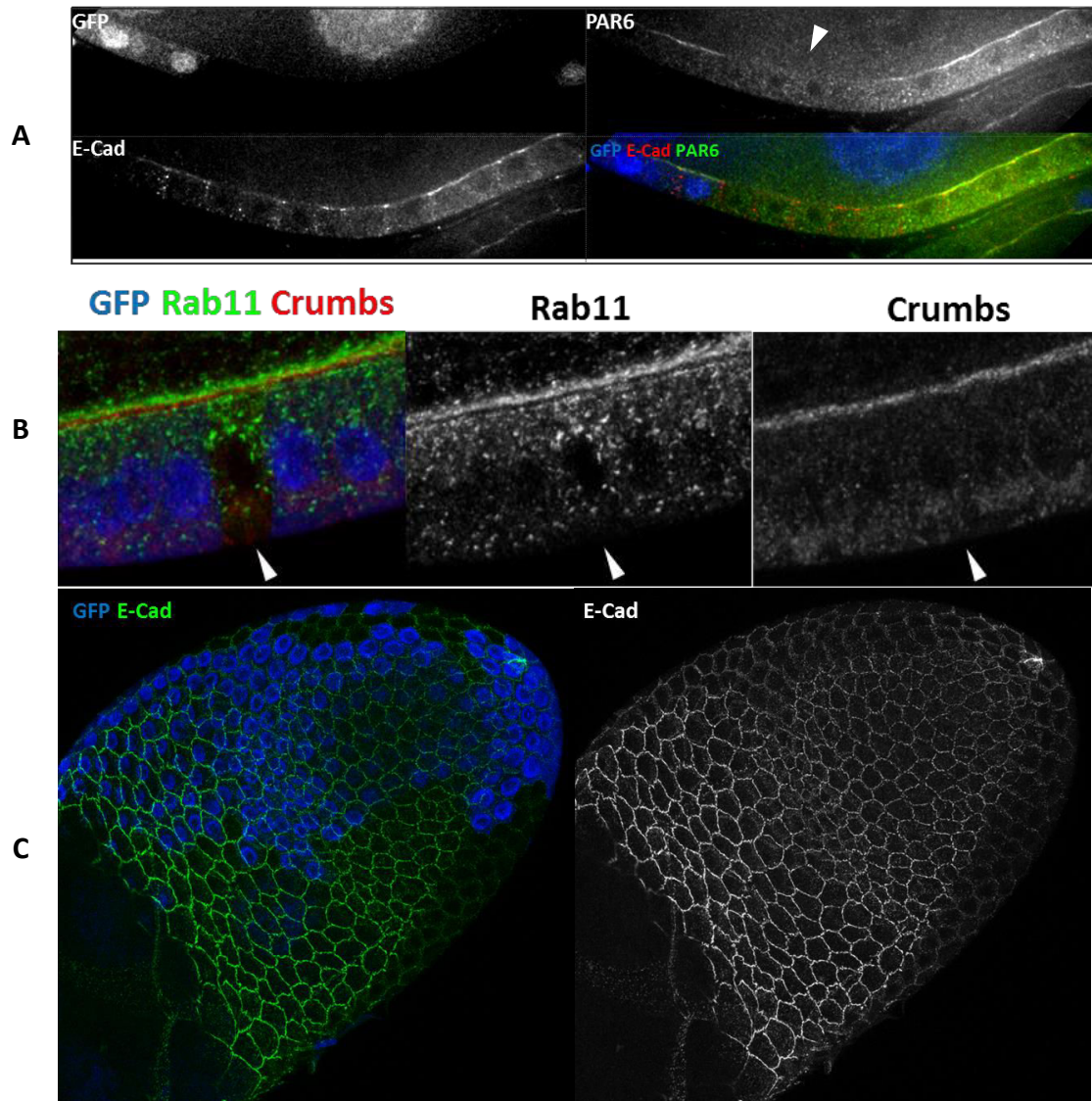
**Figure 28.** Localisation de la sous-unité  $\alpha$  d'AP-2 dans des clones  $\mu 2$  (cellules avec astérisques jaunes) dans le notum. Ce plan focal montre le pôle apical des cellules, le marquage ponctué entre les contacts cellules/cellules correspond donc à la membrane plasmique apicale des cellules plutôt qu'à des vésicules intracellulaires.



## AP-1 et maintenance de la polarité de l'épithélium folliculaire.

### 1. La polarité apico-basale des cellules folliculaires n'est pas affectée dans les mutants AP-1

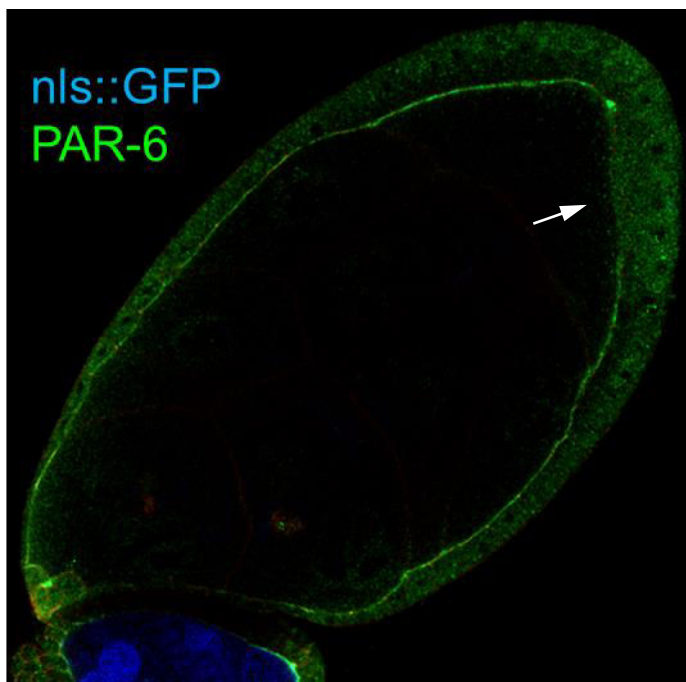
La polarité de l'épithélium folliculaire est mise en place au début de l'ovogénèse (page 34) et maintenue tout au long des divers mouvements morphogénétiques (page 48) qu'il subit. J'ai induit des clones *AP-47<sup>SHE11</sup>* dans cet épithélium et observé la localisation des protéines apicales Par-6 et Crb ainsi que d'E-Cad du début de l'ovogénèse au stade 10. Aucun cas de délocalisation de Crb (Fig 29B, environ 40 clones mutants) et aucun défaut observable de localisation de E-Cad, qu'il s'agisse de E-Cad::GFP ou d'un marquage de E-Cad endogène (Fig. 29C, plus d'une centaine de clones), quel que soit le stade de l'ovogénèse observé. Je n'ai observé qu'un seul cas de perte de localisation apicale de Par-6 sur environ 80 clones de cellules mutantes.



**Figure 29.** Clones de cellules mutantes *AP-47<sup>SHE11</sup>* (perdant le marqueur GFP en bleu) dans l'épithélium folliculaire. **(A)** Seul défaut (pointe de flèche, 1/80) de localisation de Par-6 observé (stade 8) dans quelques cellules d'un clone **(B)** Aucun défaut de localisation de Crb n'a été observé (n=40 chambre d'oeufs) mais les endosomes Rab11-positifs peuvent apparaître plus brillants ou élargis dans les cellules mutantes (pointe de flèche). **(C)** Aucun défaut de localisation d'E-Cad n'a été observé (n>100 chambres d'oeuf).

## 2. La polarité apico-basale est affectée dans les doubles mutants AP-1/GGA

GGA est une autre protéine adaptatrice pouvant compenser partiellement la fonction d'AP-1 dans l'adressage lysosomal (page 14). Chez la Drosophile, les mutants GGA sont viables (Luan et al., 2012), probablement en raison d'une compensation fonctionnelle par AP-1. Pour tester si GGA pourrait être capable de compenser fonctionnellement la perte de fonction d'AP-1 dans la maintenance de la polarité épithéliale, j'ai observé la localisation de Par-6 dans des double mutants *AP-47<sup>SHE11</sup>/GGA*. J'y ai observé une perte de la localisation apicale de Par-6 dans 4/7 chambres d'œuf (Fig. 30), suggérant que GGA et AP-1 ont bien une fonction redondante dans le maintien de la polarité épithéliale dans l'épithélium folliculaire. Comme dans le seul cas similaire observé dans les simples mutants *AP-47<sup>SHE11</sup>*, cette délocalisation n'est observée que dans une fraction des cellules mutantes. La localisation d'E-Cad et d'autres marqueurs de polarité dans ces doubles mutants reste à caractériser. Pour tester si cette compensation s'étendait à d'autres épithélia où la perte de fonction d'AP-1 seul n'affecte pas la maintenance de la polarité, j'ai commencé à observer la localisation de Par-6 dans le notum pupal et le disque imaginal larvaire. Dans ces tissus, je n'ai pour l'instant pas observé de défaut de polarité dans les clones double mutants *AP-47<sup>SHE11</sup>/GGA* (n=1 notum et 2 disques imaginaux d'aile).



**Figure 30.** Perte de la localisation apicale de Par-6 (flèche) dans un épithélium folliculaire entièrement composé de cellules double mutantes pour *AP-47* et *GGA*. Ce phénotype a aussi été observé dans des épithéliums mosaïques.



## Article

### Résumé en français

Au cours de ces expériences sur l'épithélium folliculaire, j'ai aussi induit des pertes de fonction d'AP-1 dans le cyste germinale. Ce cyste est composé de 15 cellules nourricières et d'un ovocyte. Ces cellules sont connectées entre elles par des ring canals, des ponts cytoplasmiques assemblés à l'issue de cytokinèse permettant les échanges cytoplasmiques entre elles.

J'y ai d'abord observé que dans les mutants AP-1, les membranes plasmiques séparant les cellules nourricières entre elles sont correctement établies mais disparaissent progressivement au cours de l'ovogénèse, donnant lieu à des cellules multinucléées. L'observation en temps réel de cette rupture dans des chambres en culture a révélé qu'elle avait lieu au niveau des ring canals connectant les cellules entre elles : la membrane plasmique se décroche des ring canals et fragmente immédiatement après. J'ai ensuite noté que ces cellules mutantes présentaient des endosomes de recyclage positifs pour Rab11 élargis, et que la surexpression d'une forme dominante négative de Rab11 dans le cyste germinale causait aussi une multinucléation des cellules nourricières.

Dans les cellules nourricières, E-Cad localise à des clusters répartis de façon homogène sur l'ensemble de leur surface, sauf autour des ring canals où ces clusters apparaissent plus brillants et plus nombreux. Dans les mutants AP-1 et les cystes surexprimant le Rab11 dominant négatif, ce défaut d'ancrage des ring canals corrèle avec une perte de l'enrichissement d'E-Cad autour des ring canals. Cette corrélation suggère qu'E-Cad est nécessaire à l'ancrage des ring canals. Cette hypothèse est corroborée par le fait que les mutants  $\beta$ -Cat présentent un phénotype de multinucléation des cellules nourricières, mais est contredite par des études précédentes sur E-Cad. J'ai montré que l'absence de multinucléation dans les mutants null E-Cad était due à une expression ectopique de N-Cad,

une autre cadhérine classique capable de compenser la fonction d'E-Cad dans l'ancrage des ring canals. La perte de fonction simultanée de E-Cad et N-Cad cause une multinucléation des cellules nourricières.

Des images de microscopie électronique à transmission (MET) obtenues par Irina Kolotueva montrent que la multinucléation observée dans les mutants AP-1 n'est pas due au décrochage de l'anneau d'actine qui compose le ring canal, mais que c'est plutôt la membrane entourant le ring canal qui se décroche du reste de la membrane plasmique. Ces images de MET ont aussi révélé à la surface des cellules nourricières la présence de protrusions membranaires ayant l'apparence et les dimensions des microvillosités présentes au pôle apical des cellules épithéliales. Ces microvillosités couvrent toute la surface des cellules nourricières mais sont beaucoup plus nombreuses dans une zone de la membrane plasmique située entre le ring canal et les clusters d'E-Cad enrichis autour du ring canal. Dans les cystes mutants pour AP-1, les microvillosité entourant le ring canal mais pas celles présentes au reste de la membrane plasmique sont affectées, tout comme les clusters d'E-Cad sont spécifiquement affectés au niveau des ring canals, et la perte de fonction d'E-Cad affecte l'ensemble des microvillosités. Ces données indiquent qu'E-Cad est nécessaire à l'organisation de ces microvillosités, malgré le fait que les clusters d'E-Cad ne localisent pas à ces microvillosités.

Nous concluons de l'ensemble de ces observations qu'un transport d'E-Cad AP-1 dépendant via les endosomes de recyclage Rab11-positifs aux ring canals est nécessaire pour l'organisation E-Cad-dépendante de microvillosités participant à l'ancrage des ring canals à la membrane plasmique (voir figure 31 page 88).

**An AP-1 and Rab11-dependent E-Cadherin trafficking defect reveals a role for E-Cadherin in RCs anchoring in *Drosophila* germline cysts**

Nicolas Loyer<sup>1,2</sup>, Irina Kolotueva<sup>1,2,3</sup>, Shinya Yamamoto, Hugo Bellen and Roland Le Borgne<sup>1,2§</sup>

<sup>1</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 6290, Rennes, France

<sup>2</sup> Université Rennes 1, Institut de Génétique et Développement de Rennes, UEB, SFR BIOSIT, Rennes, France

<sup>3</sup> Electron Microscopy Facility – Mric-TEM, Rennes, France

Tel: 33 223 234 894

Fax: 33 223 234 478

§ **Corresponding author:** [roland.leborgne@univ-rennes1.fr](mailto:roland.leborgne@univ-rennes1.fr)

***Running title:* E-Cadherin dependent anchoring of RCs**

During gametogenesis of several vertebrate and invertebrate organisms, intercellular communication is ensured via large cytoplasmic bridges called RCs (RCs) resulting from incomplete cytokinesis. Despite several screens aimed to identify genes involved in RC structure and development, how RCs anchor to the plasma membrane (PM) remains unknown. Here, we report that loss of the clathrin adaptor complex AP-1 in *Drosophila* female germline cysts results in mislocalisation of E-Cadherin from the PM surrounding the RCs into enlarged Rab11-positive endosomes and ultimately detachment of the PM from the RCs. Dominant-negative Rab11 causes similar phenotypes. We further show that this phenotype, also seen in  $\beta$ -catenin mutants, was not observed in E-Cadherin mutants before because N-Cadherin is upregulated, recruits  $\beta$ -Catenin and therefore substitutes for E-Cadherin. TEM analyses revealed the presence of interdigitated microvilli-like structures that wrap the RCs and are positive for actin,  $\alpha$ -actinin and phospho-Moesin. We propose that sustained E-Cad-dependent adhesion supported by AP-1 and Rab11-dependent E-Cadherin trafficking to RCs organizes the actin-based microvilli meshwork and ensures proper attachment of RCs to PM.

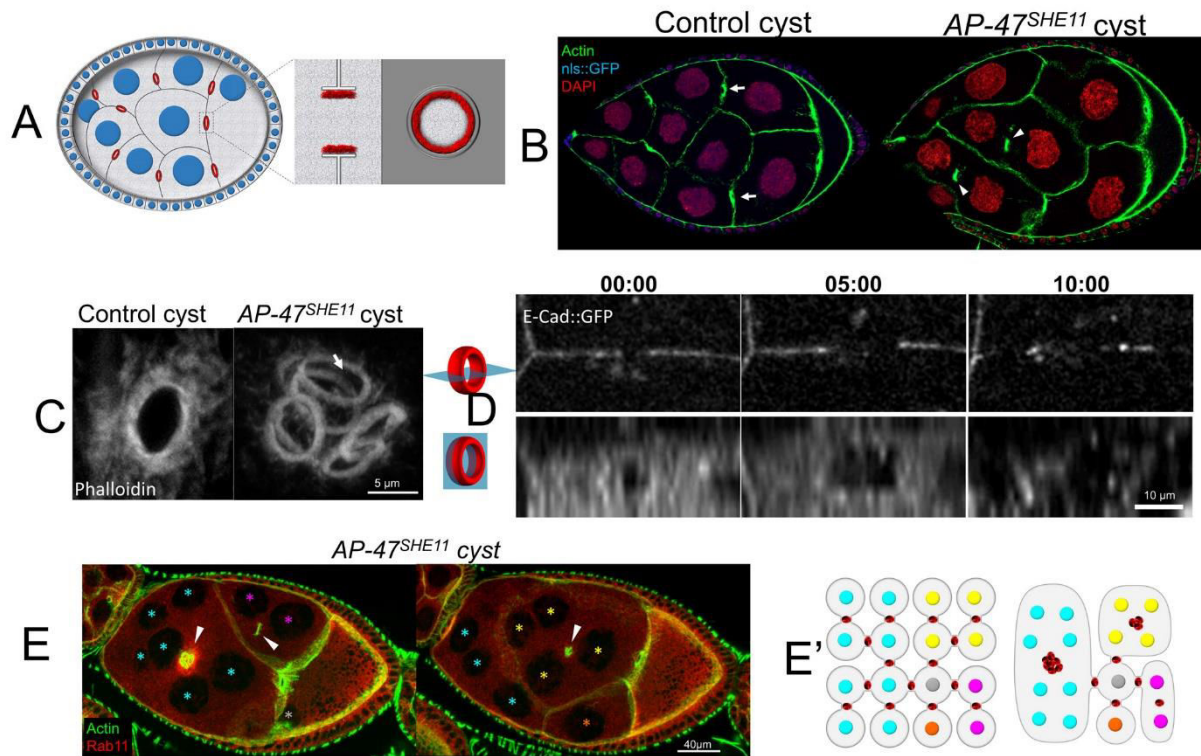
During mitotic divisions, gametes of males and females develop as syncytia connected by large cytoplasmic bridges called RCs (Brown and King, 1964; Burgos and Fawcett, 1955). RCs have most extensively been studied in the *Drosophila* female germline cyst. Four divisions of a cystoblast cell at the earliest stage of oogenesis generate 15 nurse cells and one oocyte. These cells are separated by a PM and a subcortical actin cytoskeleton, and interconnected by RCs through which intercellular material can traffic from the nurse cells to the developing oocyte (Fig. 1a). These RCs are arrested cleavage furrows, which unlike typical cleavage furrow that contract in mitosis, expand during development of the germline cyst (Tilney et al., 1996).

A variety of proteins involved in RC structure and development have been identified in screens designed for mutants failing to form these structures. Most of these genes are controlling or encoding actin-binding proteins such as the Adducin Hu-li tai shao (Hts) (Robinson et al., 1994; Yue and Spradling, 1992), the filamin Cheerio (Sokol and Cooley, 1999), Anillin (Field and Alberts, 1995), Fascin (Cant et al., 1994), and Kelch (Kelso et al., 2002; Robinson et al., 1994). They typically organize and localize either to the inner and outer rims of RC (Fig.1a). However, the molecular machinery involved in anchoring the PM to the RC remains unknown. Mutations in several genes encoding regulators of membrane traffic affect the integrity of the PM of nurse cells, causing multinucleation and so-called floating rings

(remnants of detached RCs) (Bogard and Oliver, 2007; Coutelis and Ephrussi, 2007; Januschke et al., 2007; Murthy et al., 2005; Murthy and Schwarz, 2004; Tan et al., 2014; Vaccari et al., 2009). While in these mutants, the reasons why PM integrity is disrupted and at which location PM disruption occurs, i.e. at the RC attachment site or elsewhere are unknown, these data suggest that an unidentified membrane cargo(es) plays an essential role in PM integrity and/or anchoring RC to PM.

Our laboratory is interested in the developmental functions of the Clathrin adaptor AP-1 in *Drosophila* (Benhra et al., 2011; Cotton et al., 2013), an evolutionarily conserved heterotetrameric complex regulating membrane protein sorting events from the Trans Golgi Network (TGN) and endosomes (reviewed in (Bonifacino, 2014; Folsch, 2008; Robinson, 2004)). In polarized epithelial cells, AP-1 acts primarily as a key regulator of basolateral sorting of numerous transmembrane proteins (Benhra et al., 2011; Cancino et al., 2007; Carvajal-Gonzalez et al., 2012; Diaz et al., 2009; Folsch et al., 1999; Folsch et al., 2001; Gravotta et al., 2012; Gravotta et al., 2007; Guo et al., 2013; Hase et al., 2013; Ohno et al., 1999; Sugimoto et al., 2002). In addition, it controls the apical delivery of several cargoes and is required for the maintenance of epithelial cell polarity in *C. elegans* and in mice intestines (Hase et al., 2013; Shafaq-Zadah et al., 2012; Zhang et al., 2012).

Here, we have investigated the function of AP-1 in female germline cysts by generating homozygous *AP-47<sup>SHE11</sup>* (the  $\mu$  subunit of the AP-1 complex) mutant cysts. Phalloidin staining revealed that nurse cells of *AP-47<sup>SHE11</sup>* stage 8 and older mutant cysts progressively turned to multinucleated while RCs remnants always clustered in the cytoplasm of these multinucleated nurse cells (Fig. 1b,c; 85% of the cases, n=34). This defect paralleled the Rab6 (Coutelis and Ephrussi, 2007; Januschke et al., 2007) and components of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT)-I,-II and -III (Vaccari et al., 2009) multinucleation phenotype: it only occurred in late oogenesis stages, indicating a late membrane stability defect, and never caused loss of oocyte membrane integrity, suggesting this membrane is more robust than the nurse cells one, probably due to its differential organization and composition (Nicolas et al., 2009), in contrast with the early loss of plasma membrane integrity including the oocyte one in *sec5* and *sec6* two subunits of the exocyst complex (Murthy et al., 2005; Murthy and Schwarz, 2004) and *PI4KIIIa* (Tan et al., 2014) mutants.



**Figure 1: AP-1 controls RCs anchoring to the plasma membrane in nurse cells.** (A) Schematic representation of the germline cyst consisting in a single oocyte (Oo, nuclei) connected to 15 nurse cells via ring canals (RCs, depicted in red), and a surrounding monolayer of up to 650 somatic follicle cells (Fcs, nuclei depicted in green). (Inset) schematic representation of the RCs composed of an inner rim (Red containing the filamin Cheerio, and the adducin-like Hts) and outer rim connecting to the plasma membrane (grey, containing  $\beta$ -actinin). (B) Stage 8 egg chambers with wild-type (nls::GFP positive, blue) and AP-1 mutant (nls::GFP negative, blue) germline cysts stained with Phalloidin (green) and DAPI (red). Arrows indicate RCs connecting nurse cells in control cysts. Arrowheads point to RCs or clusters of RCs floating in the cytoplasm of multinucleated nurse cells in AP-1 mutant cysts (at least one floating ring in 29/34 mutant cyst in stage  $\geq 8$  egg chambers). (C) Maximal projections of 5  $\mu$ m of anchored and floating RCs stained with Phalloidin in respectively control and AP-1 mutant cysts. (D) Time-lapse imaging of an AP-47<sup>SHE11</sup> mutant cyst in a cultured stage 8 egg chamber. The presence of a RC is indicated by a hole (arrow) in the otherwise continuous E-Cad::GFP-positive plasma membrane at time 0. Top views are single focal planes and bottom views are maximal projections of 1.5  $\mu$ m of orthogonal sections. Plasma membrane detachment starts from the RC (t=5', n=5) and plasma membrane then fragments (t=10', n=5). (E) AP-47<sup>SHE11</sup> mutant cyst stained with Phalloidin (green) and for Rab11 (red). The two panels correspond to projections of different focal planes. We applied a minimum intensity projection on the red channel to accentuate the negative Rab11 staining of nuclei and a maximum intensity projection and a gamma filter on the green channel to accentuate the phalloidin staining of remaining nurse cells membranes. Every nurse cell but not oocyte (gray asterisk) plasma membrane initially bearing a ring canal collapsed, resulting in three syncytia containing 8, 4 and 2 nurse cells nuclei as indicated by colored asterisks and the corresponding cartoon in (E') and clusters of detached ring canals (arrowheads). (E') Stereotyped organization of the female germline cyst before and after nurse cells ring canals detachment.

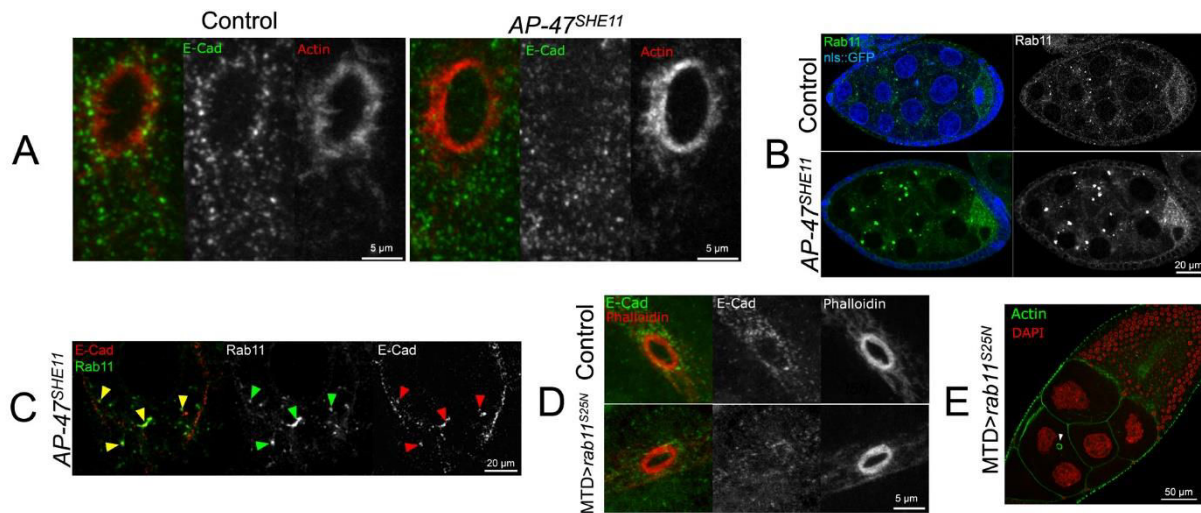
Multinucleation was also observed in AP-1 $\gamma$  mutant germline cysts albeit at lower frequency (Fig. S1), indicating that the activity of the AP-1 complex is required to prevent multinucleation. For sake of simplicity from this point on we refer to AP-47<sup>SHE11</sup> mutant cysts as AP-1 mutant. To follow the dynamics of disintegration of PM that separate nurse cells, we monitored the distribution of the PM marker E-Cadherin using an E-Cad-GFP knock-in line (Huang et al., 2009) in egg chambers. Live imaging revealed that multinucleation was due to PM detachment from RCs. This initial event was immediately followed by PM fragmentation

(Fig. 1d). We never observed fragmentation of portions of PM devoid of RCs, suggesting that multinucleation was exclusively caused by detachment of PM from the RCs. In addition, according to the stereotyped organization of the cyst established by oriented cystoblast divisions (Lin and Spradling, 1995), loss of every RCs separating nurse cells should lead to the formation of three syncytia containing two, four and eight nurse cells nuclei. This exact configuration was observed in fixed tissue analysis in *AP-1* (Fig. 1e) and *Rab6* (Coutelis and Ephrussi, 2007; Januschke et al., 2007) mutants, further indicating nurse cells multinucleation is caused by RC detachment in these mutants.

Live imaging further revealed that E-Cad::GFP localizes in small clusters homogeneously distributed on the entire surface of nurse cells (Fig. 2a). In addition to this global distribution at the PM, E-Cad clusters around RCs are brighter and more abundant. In *AP-1* mutant cysts, E-Cad clusters at the PM appears unaffected, while around RCs these clusters no longer appeared bright or more numerous (Fig. 2a). In mutant cysts E-Cad also localized to cytoplasmic puncta that were absent from controls. These cytoplasmic puncta were already present in non-multinucleated as well as multinucleated mutant nurse cells (not shown), excluding the possibility that those are solely membrane debris originating from PM fragmentation events following RCs detachment.

In mammalian cells, AP-1 controls the subcellular localization and function of the Rab11-positive recycling endosome compartment (Delevoye et al., 2009; Schmidt et al., 2009) and E-Cad transits through Rab11-positive compartments (Desclozeaux et al., 2008; Ling et al., 2007; Lock and Stow, 2005). This raises the possibility that E-Cad mislocalisation in *AP-1* mutants is due to a Rab11-dependent trafficking defect. Consistent with this proposition, Rab11 localisation changed from small endosomes distributed throughout the entire cytoplasm in control nurse cells to enlarged endosomes in *AP-1* mutant nurse cells (Fig. 2b) and E-Cad partially localized to this enlarged Rab11 compartment (Fig. 2c). To assess the effect of Rab11 on E-Cad trafficking, we overexpressed a dominant-negative form of Rab11 (Rab11<sup>S25N</sup>::YFP) that was reported to block entry into recycling endosomes in mammalian cells (Ren et al., 1998). Overexpression of Rab11<sup>S25N</sup>::YFP phenocopied the *AP-47<sup>SHE11</sup>* mutation: loss of E-Cad enrichment around RCs (Fig. 2d) and multinucleation of stage 8 and older nurse cells (Fig. 2e). As in *AP-1* mutant cysts, floating RCs were always observed in multinucleated nurse cells, suggesting multinucleation is due to RCs detachment from the PM.

Thus, in both *AP-1* and *Rab11* mutant backgrounds, decreased number of E-Cad clusters surrounding RCs correlates with RCs detachment leading to multinucleation.



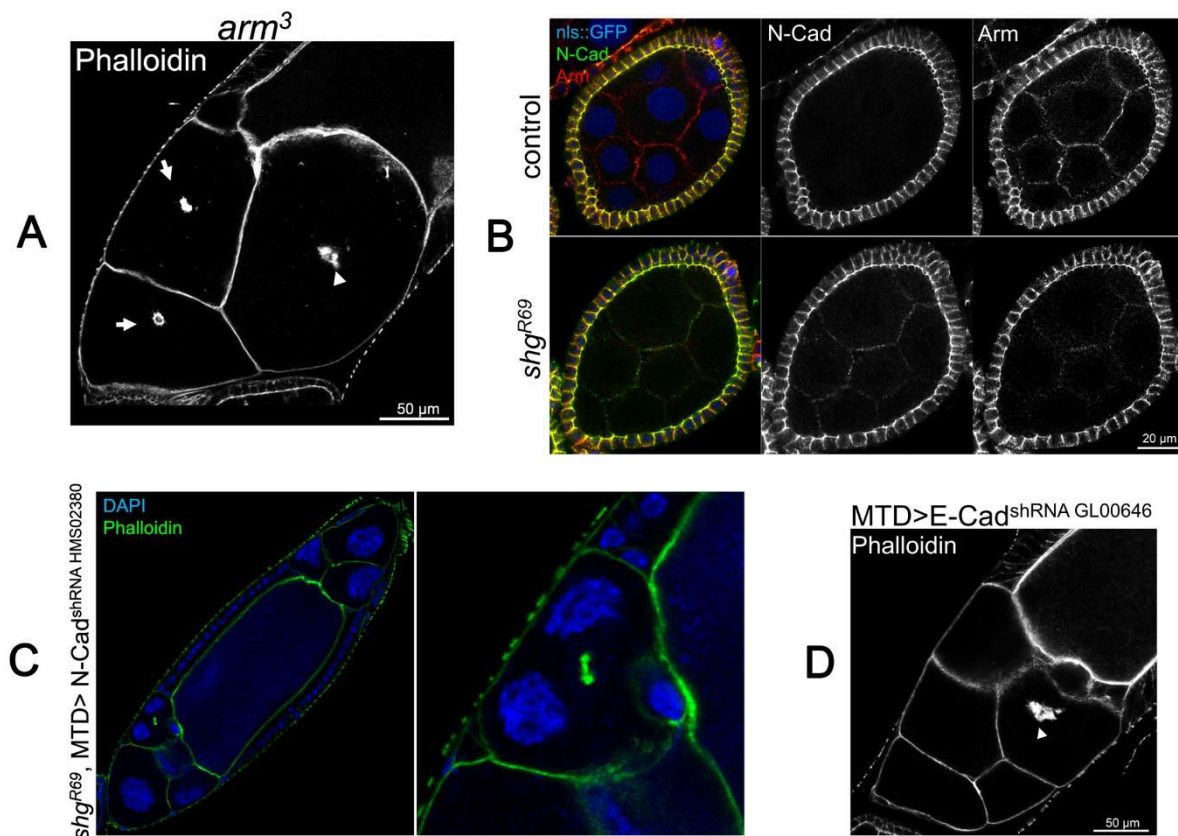
**Figure 2: AP-1 and Rab11 control E-Cad localisation.** (A) Maximal projections of 5-7µm of RCs in control and *AP-1* mutant germline cysts of stage 9 egg chambers stained for E-Cad (green) and Phalloidin (red). In stage 9 and older egg chambers, the E-Cad enrichment around RCs can be lost in *AP-1* mutant cysts (n=6 cysts). (B) Control (nls::GFP-positive) and *AP-1* mutant (nls::GFP-negative) of stage 8 egg chambers stained for Rab11. Enlarged endosomes are observed in *AP-1* mutant cysts (from stages 4 to 10, n=17/18 egg chambers). (C) Magnification of an *AP-1* mutant nurse cell stained for E-Cad and Rab11. Arrowheads point to enlarged endosomes positive for Rab11 and E-Cad (from stages 4 to 10, partial colocalisation in 12/16 egg chambers). (D) Maximal projections of 5-7µm of RCs of germline cysts overexpressing Rab11WT or Rab11S25N in stage 9 egg chambers stained for E-Cadherin (green) and Phalloidin (red). (loss of E-Cad enrichment in n=5 stage≥9 cysts) (E) Germline cyst overexpressing Rab11S25N in a stage 10 egg chamber stained for Phalloidin. Floating RCs (arrow) were seen in 9/13 stage≥8 egg chambers.

This correlation raises the possibility that E-Cad, called Shotgun (*Shg*) in *Drosophila*, is necessary to anchor RCs. Consistent with this suggestion, cysts mutant for the uncharacterized allele *shg*<sup>1</sup> (White et al., 1998) and null  $\beta$ -Catenin alleles (*arm*<sup>3</sup>, Fig. 3a); *arm*<sup>YD35</sup>, (Oda et al., 1997); *arm*<sup>XK22</sup>, (White et al., 1998) display nurse cells multinucleation. However, characterized strong (*shg*<sup>2</sup>, (Oda et al., 1997)) and null (*shg*<sup>R69</sup>, (Godt and Tepass, 1998) mutant alleles do not cause nurse cells multinucleation. We reasoned this apparent discrepancy could be explained by functional compensation by the classical Cadherin N-Cad in E-Cad null mutant germline cysts, as suggested by increased N-Cad levels in E-Cad null mutant follicular epithelial cells at mid-oogenesis (Grammont, 2007). We found that in the control situation N-Cad is not detected in the germline cyst, while in *E-Cad* null mutant cysts it was ectopically expressed and localized to the PM (Fig. 3b). Additionally, in the absence of E-Cad,  $\beta$ -Catenin still localized at the PM of nurse cells, albeit at lower levels than in controls (Fig. 3b) consistent with the idea of a functional compensation. To test this possibility, we prevented N-Cad ectopic expression by using *N-Cad*<sup>RNAi</sup> in *E-Cad* null mutant cysts. N-Cad silencing in *shg*<sup>+</sup> cysts did not cause any detectable phenotype, whereas N-Cad silencing in *shg*<sup>R69</sup> mutant cysts induced



multinucleation of nurse cells (Fig. 3c). We concluded that N-Cad is responsible for a functional compensation of E-Cad loss of function, and that E-Cad participates in RCs anchoring in nurse cells.

Additional classical Cadherin, CadN2, is partially redundant with N-Cad (Yonekura et al., 2007) and could take part in this compensation, although due to the lack of anti-CadN2 antibodies, we could not test whether it is indeed present in germline cysts. However, we depleted E-Cad by RNAi in double N-Cad, CadN2 clones to test whether loss of all three classical Cadherins would lead to multinucleation. Surprisingly, shRNA-mediated knockdown of E-Cad alone using two independent TRiP lines was sufficient to cause nurse cells multinucleation (Fig.3d). In these experiments,  $\beta$ -Cat was not recruited to the plasma membrane of nurse cells (Fig. S2), suggesting depletion of E-Cad was not accompanied by N-Cad ectopic expression, most likely due to incomplete depletion of E-Cad. This result further supports the idea that the E-Cadherin-mediated adhesion is required for RCs anchorage.



**Figure 3: E-Cadherin controls RCs anchoring to the plasma membrane.**

**(A)** Germline cysts expressing mutant for *arm* in stage 10 egg chambers stained for Phalloidin. Arrows: floating RCs (at least one floating RC in 3/4 *arm<sup>3</sup>* mutant stage $\geq$ 8 cysts). **(B)** Control and E-Cad mutant (*shg<sup>R69</sup>*) germline cysts in stage 6 egg chambers stained for N-Cadherin (green) and Armadillo (red). Ectopic expression of N-Cad was observed in 15/15 stage $\geq$ 4 *shg<sup>R69</sup>* germline cysts. **(C)** E-Cad mutant germline cyst expressing N-Cad *shRNA*<sup>HMS02380</sup> in a stage 10 egg chamber stained for DAPI (blue) and Phalloidin (green). Floating RCs (arrow) were observed in 2/6 stages  $\geq$ 8 germline cysts. **(D)** Germline

cysts expressing E-Cad *shRNA*<sup>GL00646</sup> in stage 10 egg chambers stained for Phalloidin. Arrow: floating RC (at least one floating RC in 14/22 E-Cad *shRNA*<sup>GL00646</sup> and 10/13 E-Cad *shRNA*<sup>HMS00693</sup> stage≥8 cysts).

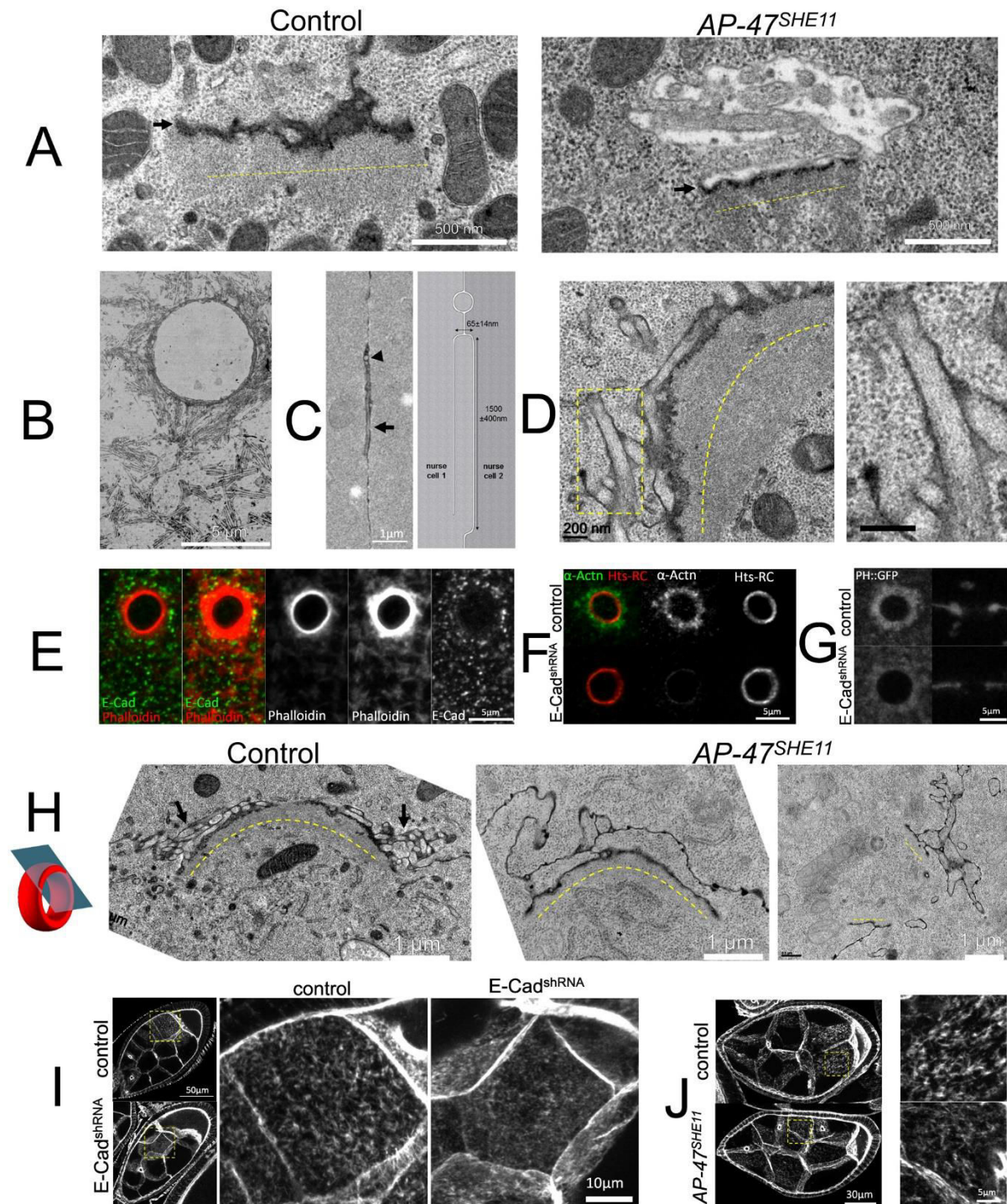
We hypothesized that E-Cad could anchor RCs by acting, *via* its binding partners  $\alpha$ - and  $\beta$ -Catenin as a physical link between PM and the subcortical actin ring. Failure to target E-Cad to RCs in *AP-1* mutants could then be responsible for detachment of this actin ring from the PM, thereby resulting in multinucleation. Using transmission electron microscopy (TEM), we found that in control cysts the subcortical actin ring (inner rim) contacts the PM through an electron-dense interface (outer rim; Fig. 1a and 4a, and S3a) (Tilney et al., 1996).

In detached RCs in *AP-1* mutant cysts, the inner rim remained associated to the PM through the electron-dense outer rim (arrow; Fig. 4a), and RC detachment is actually resulting from disconnection of a portion of PM surrounding the RCs, at ~1  $\mu$ m distance from the inner rim. Thus, based on light microscopy data, E-Cad plays a role in anchoring the RC but it is unlikely to correspond to the electron dense material. This finding prompted us to analyse more carefully the PM around RCs in control cysts. We found that RCs are wrapped by tightly packed tubular extensions of PM protruding occasionally into the intercellular space between nurse cells (Fig. 4b), similar to previously reported presence of microvillae structures at the interface between nurse and oocyte cells (Tilney et al., 1996). In *AP-1* mutants, the PM wrapping RC was less organized and irregular, with portions of plasma membrane stretching away from ring canals (Fig. 4h). Our serial block face TEM analysis revealed that these microvillae like protrusions were also observed at lower densities all over the rest of the plasma membrane (Fig. 4b, 4c) and were not detectably affected in *AP-1* mutant as judged by phalloidin staining (Fig. 4j). This indicates that loss of AP-1 specifically affects the membrane protrusions that are normally supporting RCs. As E-Cad clusters were also specifically lost from membrane surrounding the RCs in *AP-1* mutant, we next investigated the relationship between E-cad clusters and membrane protrusions wrapping RCs.

These protrusions measure  $1500\pm 400$ nm long,  $65\pm 14$ nm wide protrusions when cut longitudinally or as  $65\pm 14$ nm diameter circles when cut transversally (Fig. 4c). These protrusions contain parallel actin-like fibers aligned along the length of the protrusion (Fig. 4d), analogous to the actin-positive filaments distributed all over the PM and at higher densities around RCs observed by immunofluorescence (Fig. 4e). In addition, the actin crosslinker  $\alpha$ -Actinin localizes to a diffuse ring surrounding RCs inner rim labeled by Hts as

described in (Wahlstrom et al., 2004) (Fig. 4f)). Such a diffuse ring is also observed with PM labelling using PH::GFP probe, indicating that this region contains higher quantities of PM and strongly supporting high density of protrusions surrounding RCs found in TEM analysis (Fig. 4g). To evaluate the role of E-Cad in stabilization of membrane protrusions around RC we immunostained E-Cad and found that E-Cad clusters surrounding RCs are located at the immediate periphery of the zone of dense protrusions labeled with phalloidin (Fig. 4e) and  $\alpha$ -Actinin staining (Fig. 4f). Small E-Cad cluster distributed all over the rest of the PM do not colocalize either with actin-positive protrusions. Thus, E-Cad clusters are not a constituent and do not directly organize membrane protrusions. We noticed that the protrusions have the same size as the microvilli present at the apical pole of polarized epithelial cells, and therefore reasoned that these protrusions are microvilli-like structures. In support of this view, we found that protrusions are not only positive for actin and  $\alpha$ -Actinin but also for phospho-Moesin, a bona fide marker of apical microvillousities in epithelial cells (Fig. S3b). We therefore suggest that E-Cad clusters closely appose neighbouring nurse cells membrane through homophilic adhesion. This led us to propose that close apposition of membranes is critical for protrusions formation and/or maintenance because protrusions form specific contacts with neighbouring membranes that *in fine* could participate in RCs attachment. As this membrane organisation is lost in *AP-1* mutant, it also implies that sustained E-Cad mediated adhesion around the RCs is necessary for the formation of microvilli-like structures. Indeed, E-Cad depletion by shRNA that is not accompanied by N-Cad ectopic expression, led to loss of the diffuse  $\alpha$ -Actinin ring (Fig. 4f) and reduction of PH::GFP signals (Fig. 4g) around RCs, indicating protrusions wrapping RCs were affected upon E-Cad depletion. Upon silencing of E-Cad, actin-positive filaments distributed all over the PM of nurse cells also appeared shorter and less abundant, and instead actin appeared as densely distributing punctae decorating the whole cortex (Fig. 4i). This is in contrast to *AP-1* mutant cysts where actin-positive filaments and E-Cad clusters outside of the membrane surrounding RCs were not detectably affected (Fig. 4j). These data suggest that E-Cad-dependent adhesion *per se* is required for the assembly of microvilli-like structures, despite the fact that E-Cad itself does not reside inside the microvilli. Interestingly, E-Cad clusters were recently found to control the orientation of filopodia-like actin cables positioning nurse cells nuclei during later stages of oogenesis, although E-Cad clusters were also interspersed between the membrane-originating tips of filopodia (Huelsmann et al., 2013).





**Figure 4: Plasma membrane organization around RCs is disrupted in *AP-1* mutant cysts.** (A) Transmission electron microscopy (TEM) image of anchored and floating RCs in control and *AP-1* mutant stage 9 cysts. The inner rim (yellow dashed lines) of anchored and floating RCs is attached to the outer rim (arrow). (B) Projection over 3  $\mu$ m of several consecutive TEM image of anchored RCs and neighbouring plasma membrane in control stage 8 cysts. Microvilli-like structures appear on cuts parallel to the plane of the plasma membrane. (C) TEM image of a control stage 8 nurse cells interface sectioned perpendicularly to the plane of the PM. A longitudinally sectioned (arrow) and perpendicularly sectioned (arrowheads) microvilli-like structures are present. The cartoon on the right displays the measured dimensions of protrusions (average  $\pm$  SEM; n=75 protrusions). (D) TEM image of longitudinally sectioned protrusions in control cyst. (E) Control stage 8 fixed egg chambers stained for E-Cad (green) and Phalloidin (red). Phalloidin is displayed under two different brightness contrast settings to properly illustrate faint Phalloidin-positive filaments all over the cortex and the much brighter Phalloidin signal at the inner rim and at the periphery of RCs. (F) Control and E-Cad *shRNA*<sup>GL00646</sup> fixed stage 8 egg chambers stained for  $\alpha$ -Actinin (green) and the inner rim marker Hts-RC (red). (G) Control and E-Cad *shRNA*<sup>GL00646</sup> live stage 8 egg chambers expressing the PH::GFP probe. (H) TEM image of control and *AP-1* mutant stage 8 cysts RCs. (I) Control and E-Cad *shRNA*<sup>GL00646</sup> fixed stage 9 egg chambers stained for Phalloidin. (J) Control and *AP-1* mutant fixed stage 8 egg chambers stained Phalloidin. Insets on the right are magnification of boxed areas in i and j.

Our study implies that AP-1 controls polarized sorting of E-Cad to RCs, where E-Cad-dependent adhesion between nurse cells is required to organize microvilli-like structures and to anchor RCs to the PM. While our data confirm and further extend the notion that AP-1 complex is required for E-Cadherin localization (Hase et al., 2013; Ling et al., 2007) whether E-Cad is directly recognized and sorted by AP-1 is still unknown. Alternatively, E-Cad trafficking defects in AP-1 mutants could indirectly be due to a defective Rab-11 positive recycling compartment function/morphology in which E-Cad is transiting. Whatever direct or not, these trafficking defects led us to reveal E-Cad functions that had previously been missed due to functional compensation by N-Cad. Increased expression of N-Cad also occurs in E-Cad mutant follicular cells (Grammont, 2007) and similar functional compensation of loss of one classical Cadherin by compensatory expression of another is likely to occur in a number of other tissues, developmental stages and organisms (mammalian genomes contain around 30 classical Cadherin genes, (Hulpiau and van Roy, 2011)).

We showed the increased density and size of E-Cad clusters around the RCs and these clusters are reminiscent to the E-Cad clusters recently described at the contact rim between cell forming adherens junctions in the absence of extracellular matrix adhesion (Engl et al., 2014). Throughout development of the germline cyst, RCs increase in every dimension and are likely to be the source of intercellular tension, giving a rationale for membrane detachment at this site rather than elsewhere along the PM. In response to intercellular tension E-Cad adhesive clusters increase their size strength and complexity (Engl et al., 2014). Our study further reveals that AP-1 and Rab11 by regulating trafficking of E-Cad to PM surrounding the RCs, also participate to the local strengthening of E-Cad dependent adhesion explaining other mutants affecting E-Cadherin localization or clustering. Defective integrity of PM resulting in floating RCs observed in Rab6 (Coutelis and Ephrussi, 2007; Januschke et al., 2007), exocyst (Murthy et al., 2005; Murthy and Schwarz, 2004), ESCRT (Vaccari et al., 2009), Arp2/3 (Hudson & Cooley, 2002), and PI4PKIIIa (Tan et al., 2014) could easily be explained by an E-Cad trafficking defect.

We propose E-Cad could act by organising apical-like micro-domains at the nurse cell plasma membrane necessary to formation and/or maintenance of microvillousities, by controlling the localisation and function of polarity proteins. Indeed, Baz, and Lgl, but not Par-6 show a strong localization to the plasma membrane of nurse cells. It will be important to determine whether they (and other polarity proteins such as Crumbs) localise to microvillousities, E-Cad clusters or

to the space between them and whether they interact one with another to control their respective localisations and functions as they do in epithelial cells.

## **Acknowledgments**

We would like to thank F. Payre, A. Guichet, Y. Hong, U. Tepass, the Bloomington and Kyoto Drosophila stock centers, the TRiP at Harvard Medical School (NIH/NIGMS R01-GM084947) for providing transgenic RNAi fly stocks used in this study, and the Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa) for providing reagents. Thank you to A. Guichet and N. Tissot (Institut Jacques Monod) for teaching N.L. how to perform time lapse imaging of egg chambers, and microscopy Rennes Imaging Center-PICT-IBISA imaging facility.

N.L. received doctoral fellowships from the MNERT and ARC.

This work was funded by the Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Rennes1, The National Agency for Research (Blan-05-ApiNotch) and La Ligue Nationale Contre le Cancer ().

## **Author contributions**

N.L. and R.L.B. designed the study and wrote the manuscript. N.L. carried out the light microscopy microscopy work, all the genetic and cell biology experiments. I.K. carried out the electron microscopy work. S. Y and H.B. generated the AP-1 $\gamma$  allele.

## **Material and Methods**

### **Drosophila stocks and genetics**

*AP-47<sup>SHE11</sup>* clones were recovered from:

- *y, w, hs-FLP/+ ; + ; FRT82B, AP-47<sup>SHE11</sup>/FRT82B, Ubi-GFP(S65T)nls* for immunofluorescence
- *y, w, hs-FLP/+ ; E-Cad::GFP/+ ; AP-47<sup>SHE11</sup>/FRT82B, P(Ubi-mRFP.nls)3R* for live imaging of egg chambers
- *y, w, hs-FLP/+ ; + ; FRT82B, AP-47<sup>SHE11</sup>/FRT82B, P(ovoD1-18)3R* for electron microscopy

Rab11 dominant-negative expressing germline cysts were recovered from:

- Otu-GAL4/+ ; Nos-GAL4/+ ; Nos-GAL4/ P(UASp-YFP.Rab11.S25N)06

*shg*<sup>R69</sup> clones were recovered from:

- *y w hs-FLP* / *w* ; FRT42B, *shg*<sup>R69</sup> / FRT42B, P(Ubi-GFP.nls)2R1 P(Ubi-GFP.nls)2R2

*shg*<sup>R69</sup> N-Cad-shRNA expressing germline cysts were recovered from:

- *y* Otu-GAL4/+ ; Nos-GAL4/+; Nos-GAL4/ P(TRiP.HMS02380)

*shg*<sup>R69</sup> N-Cad-shRNA expressing germline cysts were recovered from:

- *y w hs-FLP*/Otu-GAL4; FRT42B, *shg*<sup>R69</sup> / FRT42B, P(Ubi-GFP.nls)2R1 P(Ubi-GFP.nls)2R2; Nos-GAL4/P(TRiP.HMS02380)

E-Cadherin-shRNA expressing germline cysts were recovered from

- Otu-GAL4/+ ; Nos-GAL4/+; Nos-GAL4/P(TRiP.HMS00693)
- Otu-GAL4/+ ; Nos-GAL4/P(TRiP.GL00646); Nos-GAL4/+

PH::GFP, E-Cadherin-shRNA expressing germline cysts were recovered from

- Otu-GAL4/+ ; Nos-GAL4/Ubi-PH::GFP; Nos-GAL4/+

*arm*<sup>3</sup> clones were recovered from

- *arm*<sup>3</sup>, FRT19A/ P(Ubi-GFP.nls), *hs-FLP*, FRT19A ; + ; +

Unless otherwise stated, fly stocks were obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center. Other fly stocks used are: Knock-in E-Cad::GFP allele (Huang et al., 2009), FRT42B, *shg*<sup>R69</sup> (Godt and Tepass, 1998), FRT82B, *AP-47*<sup>SHE11</sup> (Benhra et al., 2011), *arm*<sup>3</sup>, FRT19A (REF), and Ubi-PH::GFP (PH domain of phospholipase C $\delta$ ) (Claret et al., 2014). The MTD-GAL4 line was used to drive GAL4 expression in germline cysts.

### Immunofluorescence and antibodies

Ovaries from 1 to 3 days old female flies were dissected in PBS to isolate individual ovarioles, which were immediately fixed for 20 minutes in 4% formaldehyde (with the exception of  $\alpha$ -Actinin and P-Moesin stainings, which required instead a 5 minutes fixation with 1% TCA in PBS. Fixator was briefly washed 3 times in PBS and ovarioles were permeabilized for 2 hours

in PBS, 0,1% Triton (PBT). Ovarioles were then incubated in primary antibodies diluted in PBT for 2 to 3 hours, washed 3 times for 15 minutes in PBT, incubated for 45 minutes in Cy2, Cy3 or Cy5-coupled secondary antibodies (Jackson's Laboratories) and/or Phalloidin-Alexa-647 (Life Technology), washed 3 times for 10 minutes in PBT, incubated for 5 minutes in DAPI, rinsed 3 times in PBS, once in 50% Glycerol, and mounted in MM (90% glycerol, 2.5% n-propyl gallate (Fluka Analyticals) in 1X PBS) and finally mounted between slide and coverslips using two bands of stretched parafilm as 70-90µm-large spacers. Every step was performed at room temperature.

Primary antibody were rat anti-DE-Cad (DCAD2, 1:100), rat anti-N-Cad (DSHB), mouse anti-Rab11 (1:100, DSHB), mouse anti-Armadillo (DSHB?), rabbit anti-γ-Adaptin (Benhra et al, 2011), rat anti-α-Actinin (DSHB), mouse anti-Hts-RC (1:5, Creative Diagnostics), anti-P-Moesin (Ref NCB, (Polesello et al., 2002)).

### **Culture of egg chambers for live imaging**

Live ovarioles were dissected and maintained in 15% FCS, 200µg.ml<sup>-1</sup> insulin (SIGMA), pH 7 Schneider medium as described in (Prasad et al., 2007). Ovarioles were immersed in as few medium as possible and medium was covered by mineral oil to prevent evaporation whilst allowing proper oxygenation. Live imaging was performed using a spinning disk confocal microscope: Z stacking of 1.5µm, one stack of 8 to 10 images every 5 to 7 min to avoid phototoxicity.

### **Fluorescence imaging**

Fixed specimens and movies were acquired using LSM Leica SP5 and LSM Leica SP8 microscopes equipped with 63X plan Apo-N.A. 1.4 and 100X plan Apo-N.A. lenses or using spinning disc confocal microscopy on a Nikon Ti-E microscope equipped with CSU-X1 disk, a Cool-SNAP-HQ2 camera (Roper Scientific), a piezo stage, a 100/3 plan Apo-NA 1.4 lens, 491 (50 mW) and 561 (50 mW) lasers, under the control of the MetaMorph Software.

### **Image processing**

Images were processed with the ImageJ software packages (NIH, USA). We always applied a 0.8 pixels wide Gaussian blur to increase signal to noise ratio for better visualization. Images presented as controls and non-controls are from the same experiments and are displayed under the same brightness/contrast settings. Projections of confocal stacks are maximum intensity projections, except for Fig 1E where we used minimum intensity projections to



accentuate nuclear negative staining and in and Fig. 4B where we used minimum intensity projections to visualize electron dense plasma membranes.

### **Electron microscopy**

For chemical fixation *Drosophila* ovaries were dissected from adult females in PBS and were immediately fixed in a mix of 1% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer for two hours at room temperature. A one-hour incubation in 1% OsO<sub>4</sub> and 1% K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] was followed by a one-hour incubation with 1% tannic acid. Further incubation in 2% OsO<sub>4</sub> was followed by one-hour incubation in 1% uranyl acetate (UAc) at ambient temperature (Starborg et al., 2013) (Starborg et al., 2013; Kolotuev, 2014). After the dehydration cycles, samples were embedded in Epon-Araldite mix (EMS hard formula). For high pressure freezing, ovaries were dissected in PBS and immediately transferred to 20% BSA for cryo-protection. Substitution was performed with 1% OsO<sub>4</sub>, 0.1% UAc diluted in anhydrous acetone. Following the substitution procedure, samples were embedded in Epon-Araldite mix (Kolotuev et al 2010; Kolotuev, 2014).

To assure precise orientation and access to the samples 2-step flat embedding procedure was used (Kolotuev, 2014). Flat samples mounted for observation with high-resolution DIC images acquired for reference using Leica SPE confocal microscope equipped with 63 x Leica oil immersion objectives. To determine precisely sample orientation and the zone of interest, the surface of the blocks was scratched with micro-dissector apparatus laser beam (Veritas, Applied Biosystems).

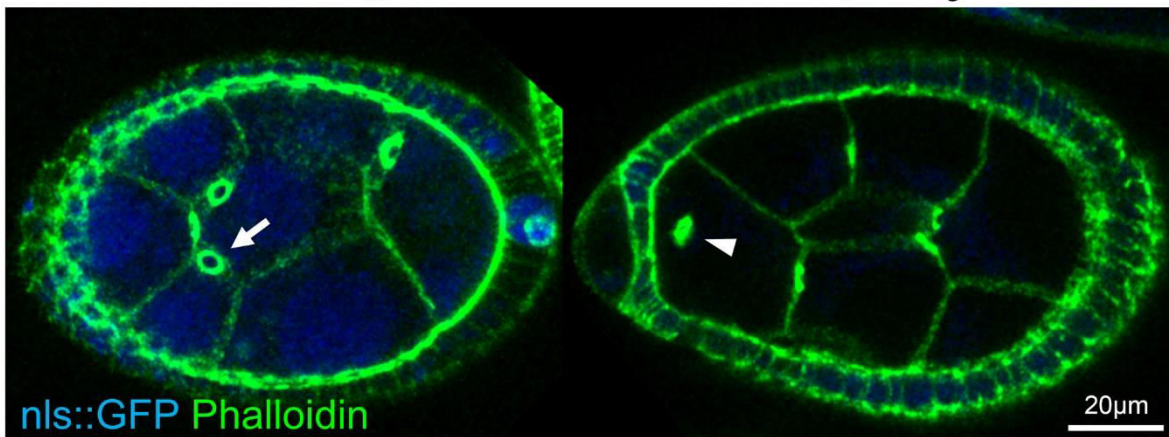
For sectioning, rigid flat blocks were trimmed using 90° diamond trim tool (Diatome, Switzerland) to delimit the zone of interest based on laser marks. Samples were directly processed to thin sectioning using 35° diamond knife (Diatome, Switzerland). For high resolution analysis sections were collected on formvar-coated slot grids (EMS).

TEM observation was done with a JEOL JEM-1400 electron microscope operated at 80kV, equipped with a Gatan Orius SC 1000 camera, piloted by the Digital Micrograph program. Micrographs were analyzed using ImageJ and Adobe Photoshop programs.

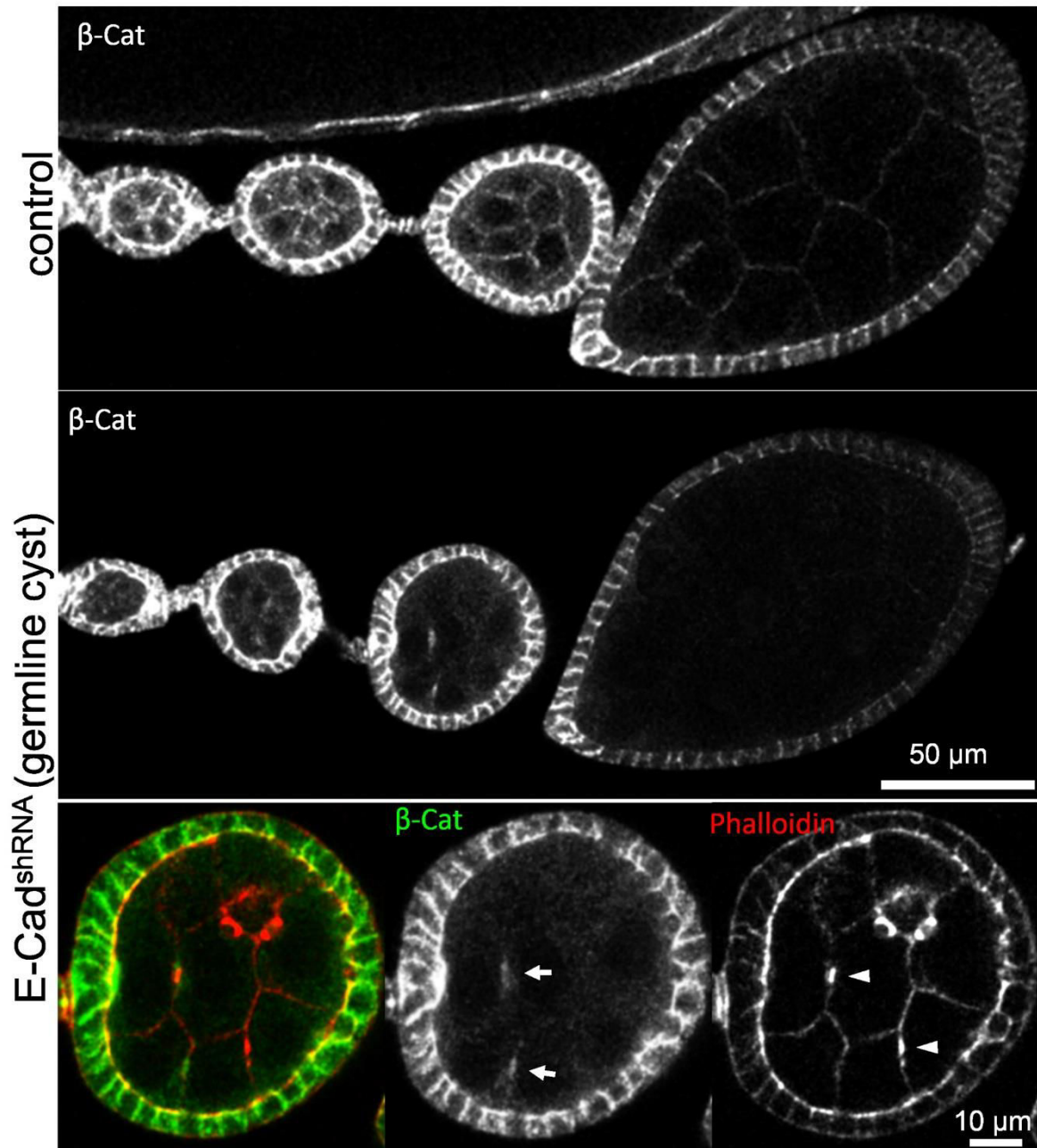
For 3view system data acquisitions rigid flat blocks were mounted on aluminum pins. XXX – information from Tobias. Dataset was analyzed using IMOD 3dmod program.

Control cyst

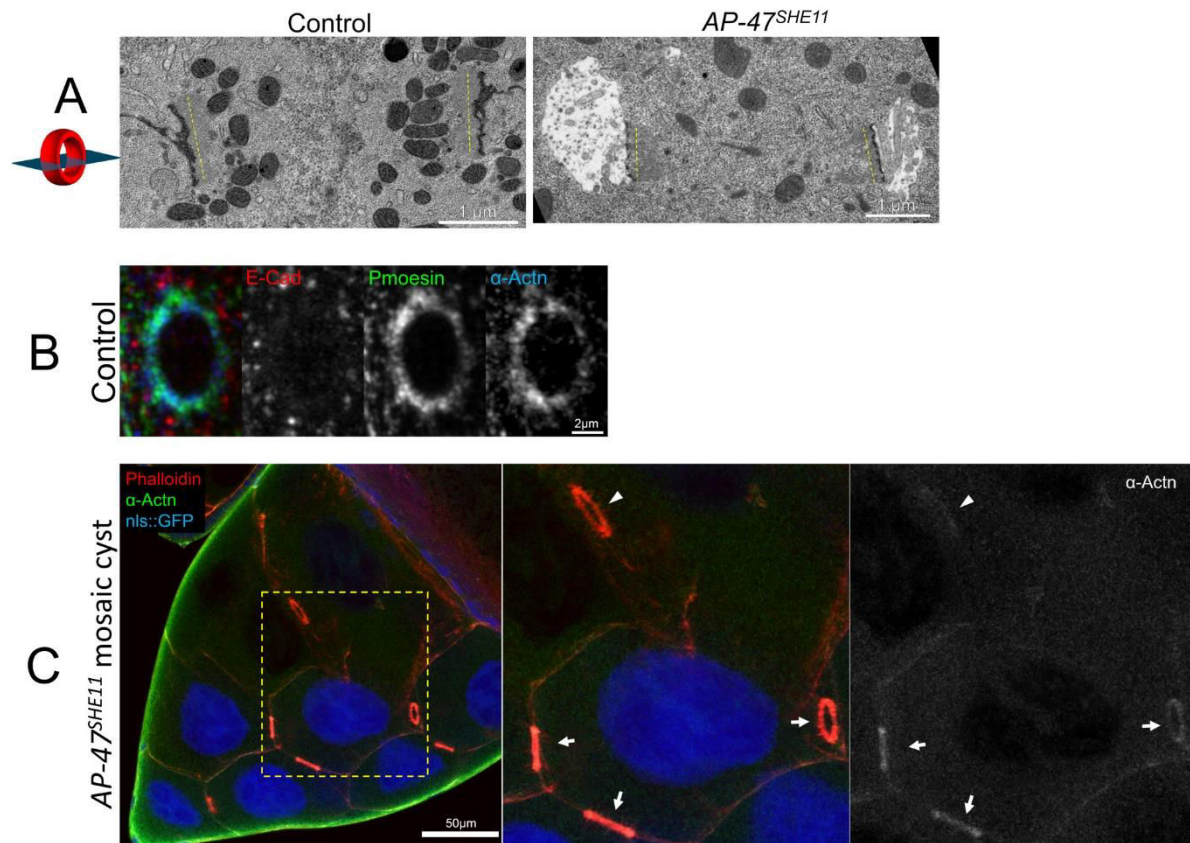
*AP-1 $\gamma^B$*  cyst



**Figure S1: Multinucleation in *AP-1 $\gamma^B$*  mutant cysts.** Projections of 8 confocal stacks (over 6  $\mu\text{m}$ ) of stage 6 egg chambers with wild-type (nls::GFP positive, blue) and *AP-1 $\gamma^B$*  mutant (nls::GFP negative, blue) germline cysts stained with Phalloidin (green). Arrows indicate ring canals connecting nurse cells in control cysts. Arrowheads point to ring canals or clusters of ring canals floating in the cytoplasm of multinucleated nurse cells in the mutant cysts (multinucleation 1/6 mutant cyst in stage  $\geq 6$  *AP-1 $\gamma^B$*  egg chambers).



**Figure S2.** Control and MTD>E-Cad<sup>shRNAGL00646</sup> ovarioles stained for  $\beta$ -Cat (green in bottom panels) and Phalloidin (red in bottom panels). In E-Cad<sup>shRNAGL00646</sup>,  $\beta$ -Cat localises to small membrane patches in stage  $\leq 6$  cysts (n=5, arrows on bottom panels) localizing or not to ring canals (arrowheads on bottom panels) and is absent from the membrane in stage  $\geq 7$  cysts (n=16).



**Figure S3. (A)** Transmission electron microscopy (TEM) image of anchored and floating RCs in control and *AP-1* mutant stage 9 cysts. The actin ring of anchored and floating RCs are attached to an electron dense plasma membrane. Yellow dashed lines indicate the position of RCs inner rim. **(B)** Ring canal of a control stage 9 egg chamber stained for E-Cad (red), phospho-Moesin (green) and  $\alpha$ -Actinin (blue). Phospho-Moesin and  $\alpha$ -Actinin localise to a diffuse ring surrounded by more peripheral E-Cad clusters. To make sure the more peripheral location of E-Cad clusters was not due to spreading due to the egg chamber being squeezed mounted between glass and coverslip, egg chambers were not squeezed for this experiment and were simply resting on the coverslip in a drop of mounting medium. **(C)** *AP-47<sup>SHE11</sup>* mosaic germline cyst in stage 10 egg chamber stained with Phalloidin (red) and for  $\alpha$ -Actinin (green). The nls::GFP clonal marker (blue) is lost from some nurse cells, indicating that these cells are *AP-47<sup>SHE11</sup>* mutants and that the clonal marker still produced by control cells does not diffuse to a great extent from. Middle and right panels are magnifications of the boxed area in the left panels, where three control (arrows) and one *AP-47<sup>SHE11</sup>* mutant (arrowheads) are on the same focal plane. The  $\alpha$ -Actinin signal in ring canals was 2 to 3 times higher in control cells (n=5 ring canals) than in *AP-47<sup>SHE11</sup>* mutant cells (n=4 ring canals).

Troisième partie

## **Discussion**

## Conclusions du travail de thèse

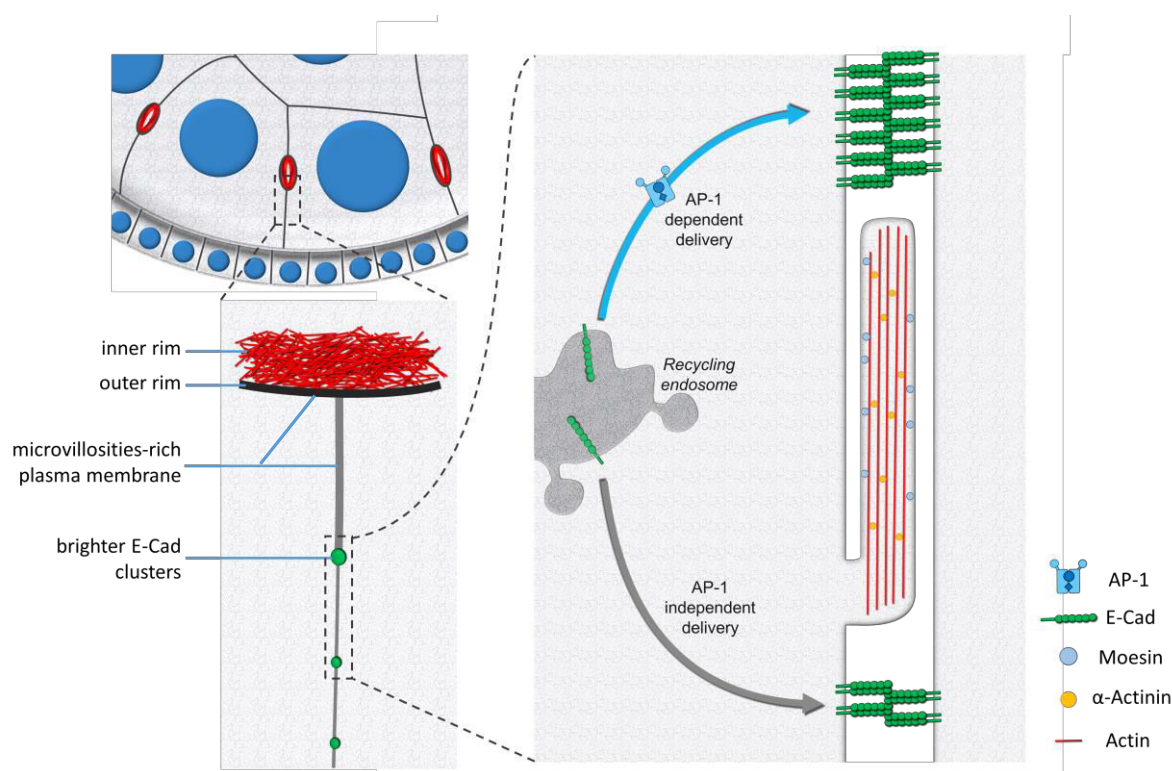
La conclusion principale de mes travaux est que la molécule d'adhésion E-Cad accomplit une fonction inédite dans l'ancrage de ponts intercellulaires appelés ring canals à la membrane plasmique dans le cyste germinale femelle de la *Drosophile*, que cette fonction avait jusque-là été masquée par l'expression ectopique de N-Cad, et que cette fonction s'accomplit probablement par l'organisation de microvillosités à la membrane entourant ces ring canals, un mode d'ancrage lui aussi non soupçonné jusque-là. J'ai été amené à faire cette découverte en étudiant initialement le rôle du complexe adaptateur de clathrine AP-1 sur le trafic de E-Cad dans un tout autre tissu et dans une toute autre fonction.

J'ai montré que dans le notum, un épithélium mature du thorax dorsal de la *Drosophile*, AP-1 contrôle le trafic de E-Cad : la perte de fonction d'AP-1 induit, comme dans les cellules épithéliales de mammifères en culture MDCK, une délocalisation apicale de E-Cad et réduit la vitesse de recouvrement de E-Cad aux jonctions dans des expériences de FRAP, indiquant un défaut de trafic de E-Cad dans les voies biosynthétique et/ou de recyclage. J'ai aussi confirmé dans ce tissu une délocalisation apicale des endosomes de recyclage Rab11-positifs.

Malgré ces phénotypes dans le notum, des travaux précédemment menés au laboratoire indiquent qu'AP-1 n'est pas requis pour la maintenance de la polarité épithéliale dans le notum, contrairement aux cellules intestinales de *C. elegans* et des souris. Dans l'hypothèse que des mouvements morphogénétiques dans un épithélium plus dynamique pourraient induire des défauts de maintenance de polarité dans un tissu sensibilisé par un défaut de trafic de E-Cad, j'ai testé la fonction d'AP-1 dans l'épithélium folliculaire, un tissu subissant plusieurs mouvements morphogénétiques au cours de l'ovogénèse chez la *Drosophile*. Je n'y ai cependant pas observé de défaut de maintenance de polarité, ni même un défaut de localisation d'E-Cad, et simplement un défaut mineur de localisation de Rab11. Des résultats encore préliminaires indiquent que la protéine adaptatrice GGA, une protéine fonctionnellement redondante avec AP-1 dans le transport du TGN aux endosomes dans le trafic lysosomal, pourrait en partie expliquer l'absence de défauts de polarité dans les mutants AP-1 (voir perspectives page 92).



La majeure partie de mon travail de thèse s'est concentrée sur la fonction d'AP-1 dans le cyste germinale femelle, où j'ai montré qu'AP-1 contrôle un trafic Rab11-dépendant de E-Cad. La perte de fonction d'AP-1 ou de Rab11 aboutit à un défaut de localisation de E-Cad autour des ring canals et à un décrochage des ring canals de la membrane plasmique, aboutissant à une multinucléation des cellules du cyste. E-Cad elle-même est nécessaire à l'ancrage de ces rings canaux, une fonction qui avait jusque-là été masquée par l'expression ectopique de N-Cad dans les mutants E-Cad. Des données de microscopie électronique générées par Irina Kolotueva ont montré que les ring canals sont entourés de protrusions membranaires ayant l'aspect et les dimensions des microvillosités observées au pôle apical des cellules épithéliales, et que AP-1 est nécessaire pour l'organisation de ces microvillosités. Bien qu'E-Cad ne localise pas à ces microvillosités mais plutôt à des clusters entre elles, E-Cad est nécessaire à l'organisation de ces microvillosités, qui sont vraisemblablement elles-mêmes nécessaires à l'ancrage des ring canals.



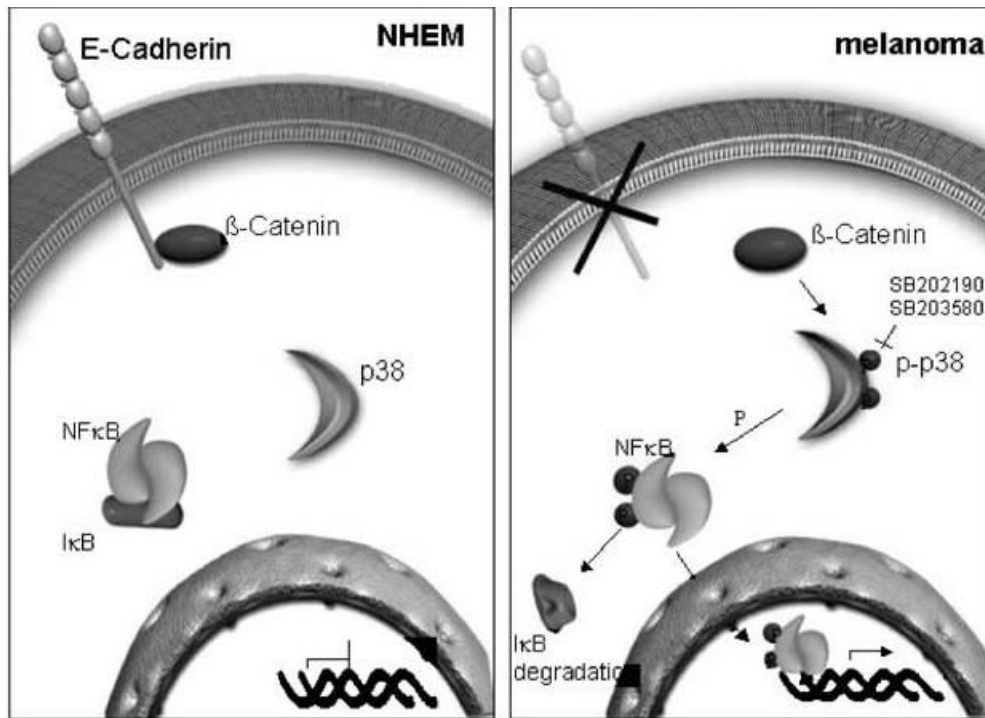
**Figure 31.** Schéma interprétatif des résultats de l'article. (voir texte plus haut).

## Perspectives

### *Compensation de E-Cad par N-Cad.*

L'ovogénèse chez la Drosophile constitue un excellent modèle d'étude in vivo de processus cellulaires et tissulaires variés dans lesquels les fonctions d'E-cad sont étudiées depuis 16 ans (voir page 49). Certaines sont connues de longue date, comme le positionnement de l'ovocyte ou la migration des cellules polaires, d'autres n'ont émergé que récemment, comme l'orientation des câbles d'actine par E-Cad à la fin de l'ovogénèse. J'en ai mis en évidence une nouvelle dans l'ancrage des ring canal, qui avait été masquée jusque-là par le fait que N-Cad est exprimée en l'absence de E-Cad, et il en reste probablement d'autres à découvrir dans ce tissu. Ce phénomène est aussi présent au moins dans l'épithélium folliculaire (c'est d'ailleurs la raison pour laquelle je l'ai testé dans le cyste germinale) : bien que N-Cad soit déjà co-exprimée avec E-Cad dans l'épithélium folliculaire, les niveaux de N-Cad augmentent en l'absence de E-Cad (Grammont, 2007). Il est donc vraisemblable que l'expression compensatoire d'une cadhérine classique en l'absence d'une autre ait lieu dans d'autres tissus et dans d'autres organismes. Ceci a potentiellement des implications majeures dans n'importe quel processus régulé par n'importe quelle cadhérine, mais le premier qui vient à l'esprit est la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), un mécanisme intervenant aussi bien dans le développement normal que dans la progression tumorale menant à la métastase. Une étape habituellement citée (e.g. Maeda et al., 2005 ; Rogers et al. 2013) dans ce processus est le « Cadherin Switch » : les cellules cessent d'exprimer E-Cad et se mettent à exprimer N-Cad, qui augmente leur motilité (Nieman et al., 1999). D'après mes observations (et celles qui vont suivre), l'expression de N-Cad pourrait dans ces contextes être une conséquence directe de la perte de E-Cad. Je n'ai pas adressé le mécanisme par lequel passe l'expression ectopique de N-Cad en l'absence d'E-Cad chez la Drosophile, mais un contrôle direct de l'expression de N-Cad par E-Cad a été décrit dans des cellules de mélanome en culture. En l'absence d'E-Cad,  $\beta$ -Cat est relâchée dans le cytoplasme où elle active la MAP kinase p38, qui active à son tour le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Kuphal et al., 2004), qui se lie au promoteur de N-Cad pour activer directement son expression (Kuphal & Bosserhoff, 2006). L'expression d'un transgène codant uniquement la partie cytoplasmique de E-Cad est suffisante pour séquestrer  $\beta$ -Cat et ainsi bloquer l'expression de N-Cad (Kuphal & Bosserhoff, 2006).





**Figure 32.** Régulation directe de l'expression de N-Cad par E-Cad. Adapté de Kuphal et al., 2004.

La conservation de cette voie chez *D. melanogaster* et d'autres inter-régulations entre cadhérines dans d'autres tissus et/ou organismes restent à démontrer. Chez les mammifères, les cadhérines classiques étant environ 30, ces inter-régulations – si elles existent – doivent exister en combinaisons très nombreuses et donc faire intervenir des mécanismes très spécifiques pour qu'une cadhérine donnée contrôle précisément l'expression d'une autre. Ce pourrait peut-être être un des rôles des séquences introniques significativement plus longues, plus nombreuses et plus riches en séquences régulatrices que dans le reste du génome dans les ARNm codant pour les cadhérines chez les vertébrés (Oliveira et al., 2012).

#### *Trafic de E-Cad dans le cyste germinale.*

Les mutants Rab6 (Coutelis & Ephrussi, 2007; Januschke et al., 2007) et ESCRT (Murthy et al., 2005; Murthy and Schwarz, 2004) présentent comme les mutants AP-1 et β-Cat ainsi que les RNAi E-Cad une multinucléation des cellules nourricières uniquement à partir du stade 8 de l'ovogénèse, c'est-à-dire à 2 ou 3 jours après l'établissement des ring canaux. Ceci suggère d'une part que le phénotype de multinucléation dans les mutants Rab6 et ESCRT est dû comme dans les mutants AP-1 à un défaut de localisation de E-Cad aux ring canaux, une hypothèse aisément testable. Ceci implique d'autre part que l'ancrage dépendant d'E-Cad et de β-Cat est dispensable aux stades plus précoces, soit parce que les microvillosités ne sont

pas dépendantes de E-Cad et  $\beta$ -Cat, soit parce qu'elles ne sont elles-mêmes pas requises à ces stades. Un ancrage est-il vraiment requis aux stades précoces, qui grandissent plus lentement qu'aux stades plus tardifs ? C'est en tout cas ce que suggère les phénotypes de multinucléation précoces observés dans les mutants exocyste (Murthy et al., 2005; Murthy and Schwarz, 2004) et PI4KIIIa (Tan et al., 2014). Si ce phénotype passe par le transport d'un cargo aux ring canals, ce cargo ne peut pas être exclusivement E-Cad, celle-ci et  $\beta$ -Cat étant dispensables à l'ancrage précoce. Il pourrait par exemple s'agir d'une mucinoprotéine codée par un gène non identifié, sécrétée très précocement aux ring canals (Kramerova et al., 1999).

#### *E-Cad et microvillosités.*

E-Cad contrôle l'organisation des microvillosités des cellules nourricières, que ce soit au niveau des ring canals ou au reste de la membrane plasmique. Il apparaît pourtant que les clusters d'E-Cad ne localisent pas à ces microvillosités mais plutôt entre elles. Comment E-Cad organise-t-elle à distance ces microvillosités ? Une première possibilité est que le rapprochement des membranes plasmiques de deux cellules nourricières permette aux microvillosités de former des interactions spécifiques entre elles et avec la membrane plasmique et ainsi de stabiliser ces microvillosités. Ceci expliquerait pourquoi la membrane des microvillosité apparaît plus dense aux électrons que le reste de la membrane plasmique (figure 4C de l'article page 77), et pourquoi les microvillosités sont pour la plupart groupées en groupes de trois ou quatre alignées parallèlement (figure 4B du papier page 77). Une autre possibilité, peut-être non exclusive avec la précédente, est que E-Cad soit capable d'organiser des microdomaines de type apicaux et basolatéraux à la membrane plasmique des cellules nourricières, de la même manière qu'E-Cad sépare les domaines apicaux et basolatéraux des cellules épithéliales. Les microvillosités émergeraient des microdomaines apicaux, tout comme elles émergent du domaine apical des cellules épithéliales. Il apparaît en effet que certaines protéines de polarité comme Par-3, Lgl (Doerflinger et al., 2010), Crb (mes observations) et Dlg (mes observations) mais pas d'autres, comme Par-6 (Doerflinger et al., 2010, mes observations), localisent au cortex des cellules nourricières. La première chose à faire est de déterminer où exactement localisent ces protéines : aux clusters d'E-Cad, aux microvillosités, ou entre les deux. En fonction de ces résultats, il pourrait être intéressant d'étudier les interdépendances entre leur localisation et celle de E-Cad, ainsi que leur fonction dans l'organisation des microvillosités et l'ancrage des ring canals. Il est intéressant de noter qu'à un stade plus tardif de l'ovogénèse, les clusters d'E-Cad contrôlent aussi à distance, peut-

être exactement de la même manière que pour les microvillosités, l'orientation de câbles d'actine émergeant de la membrane plasmique pour contrôler la position du noyau (Huelsmann et al., 2013, voir page 50). Il est même envisageable que les microvillosités assemblées aux stades précoces de l'ovogénèse soient à l'origine de ces câbles d'actines.

#### *AP-1 et maintenance de la polarité épithéliale chez la Drosophile.*

Pourquoi les cellules de l'intestin de *C. elegans* et des souris perdent-elles leur polarité apico-basale mais pas les cellules du notum et de l'épithélium folliculaire de la Drosophile ? Ces résultats pourraient suggérer qu'AP-1 est requis pour la maintenance de la polarité spécifiquement dans les épithélia tubulaires. Le fait que la polarité des cellules de l'épiderme (un épithélium non tubulaire) n'est pas affectée dans les mutants AP-1 (communication personnelle avec Grégoire Michaux, Institut de Génétique et Développement de Rennes) est en accord avec cette proposition. Il apparaît pourtant que la polarité des cellules de la trachée chez la Drosophile n'est pas affectée dans les mutants AP-1 (communication personnelle avec Véronique Brodu, laboratoire d'Antoine Guichet, institut Jacques Monod, Paris).

#### *Compensation par GGA.*

Une autre explication pourrait venir d'une redondance fonctionnelle entre GGA et AP-1 dans la maintenance de la polarité épithéliale, spécifiquement chez la Drosophile. Chez la Drosophile, les mutants GGA ne présentent aucun défaut observable, probablement en raison de la redondance fonctionnelle entre AP-1 et GGA dans le transport lysosomal décrite page 14. Dans des doubles mutants AP-1/GGA, j'ai observé une délocalisation de Par-6 du pôle apical dans 4/7 chambres d'œufs, contre 1/120 dans les simples mutants AP-1. Si ils sont confirmés, ces résultats impliqueraient à ma connaissance pour la première fois un rôle de GGA dans le transport polarisé. Il apparaît toutefois que seules quelques cellules (de l'ordre d'une dizaine dans des clones pouvant couvrir les quelques 650 cellules de l'épithélium folliculaire) présentent un défaut de localisation de Par-6 dans ce tissu, et aucune à ce jour dans l'épithélium du notum et du disque imaginal d'aile (n=1 notum et 2 disques d'aile). La compensation par GGA, si elle est avérée, ne peut donc pas complètement expliquer l'absence de défaut de polarité dans les mutants AP-1 chez la Drosophile.

### *Localisation des endosomes de recyclage.*

L'hypothèse selon moi la plus vraisemblable pour expliquer les défauts chez *C. elegans* et l'absence de défaut chez la Drosophile dans la maintenance de la polarité est la suivante : la perte de fonction d'AP-1 n'affecte pas de la même manière la localisation des endosomes de recyclage Rab11-positifs dans ces deux organismes. Chez *C. elegans*, la perte de fonction d'AP-1 a un effet drastique sur le positionnement des endosomes de recyclage : un fort enrichissement de ces endosomes sous la membrane apicale est complètement perdu (voir page 13). Au contraire, chez la Drosophile, la perte de fonction d'AP-1 induit une accumulation apicale de Rab11, évidente et reproductible dans le notum mais à peine détectable dans l'épithélium folliculaire. Il est donc concevable que la perte de polarité apicale des endosomes de recyclage soit indirectement responsable de la perte de polarité épithéliale chez *C. elegans*, et peut-être dans l'intestin de souris, où la localisation de Rab11 en l'absence d'AP-1 reste à déterminer. L'importance de Rab11 dans l'établissement et le maintien de la polarité apico-basale chez la Drosophile et dans les cellules de mammifères en culture a été décrite page 41, et Rab11 est aussi requis chez *C. elegans* pour le maintien de la polarité (communication personnelle avec Grégoire Michaux).

### *Hémicomplexes d'APs.*

Il est indéniable que les quatre sous-unités du complexe AP-1 fonctionnent ensemble : la perte de fonction d'une seule d'entre elles (quand elle n'est pas compensée par une autre isoforme) cause des phénotypes similaires chez *S. cerevisiae* (Rad et al., 1995), *S. pombe* (Ma et al., 2009), *C. elegans* (Shim et al., 2000), *D. melanogaster* (Benhra et al., 2011) et empêche le développement des organismes pluricellulaires (voir page 21). De plus, *in vivo* chez les mammifères, affecter une seule sous-unité affecte la stabilité de tout le complexe (Zizioli et al., 1999) ou au moins sa capacité à localiser au TGN et à y permettre la formation de puits recouverts de clathrine (Meyer et al., 2000). Pour ces raisons, les travaux sur les complexes APs (et c'est aussi le cas de ce travail de thèse, qui est presque entièrement basé sur un mutant de la sous-unité  $\mu 1$ ) partent généralement du principe qu'affecter une seule des sous-unités d'un complexe AP abolit la fonction du complexe entier. Est-ce véritablement le cas quel que soit le complexe AP, l'organisme, le type cellulaire ou le stade développemental ? Les levures bourgeonnantes *S. cerevisiae* et les levures à fission *S. pombe* sont d'un point de vue technique des modèles idéaux pour aborder ce problème : le complexe AP-1 n'est pas nécessaire en

condition de laboratoire à la survie de ces organismes ; *S. cerevisiae* n'a qu'une seule isoforme alternative d'une sous-unité du complexe AP-1 (la sous unité  $\mu 1$  Apm2, d'ailleurs incapable de compenser fonctionnellement Apm1 et n'ayant aucune fonction connue, Stepp et al., 1995, Yeung et al. 1999), *S. pombe* n'en a aucune (Tableau 1 page 6) ; il y est plus aisé que dans les autres modèles d'études pour AP-1 d'y d'abolir génétiquement la fonction de chacune des sous-unités, individuellement ou en commun, sans la moindre ambiguïté qui pourrait résulter par exemple d'une déplétion incomplète par interférence à l'ARN ou d'une perte de fonction partielle d'un mutant hypomorphe. Dans ces systèmes, bien que la délétion génétique de chaque gène codant pour une sous-unité d'AP-1 donne des phénotypes qualitativement similaires, ces phénotypes sont quantitativement inégaux (Tableau 2). Chez *S. cerevisiae*, la délétion de  $\beta 1$  ou  $\mu 1$  donne des défauts de croissance et de tri intracellulaire de la carboxypeptidase Y (CPY, voir aussi page 16) plus graves que la délétion de  $\gamma$  ou  $\sigma 1$  (Yeung et al., 1999). Chez *S. pombe*, la délétion de  $\beta 1$  ou  $\mu 1$  donne aussi des défauts de croissance plus graves que celles de  $\gamma$  ou  $\sigma 1$ , et ces défauts de croissance sont accentués dans les doubles délétions  $\beta 1/\gamma$  et  $\beta 1/\sigma 1$  mais pas  $\beta 1/\mu 1$ . De plus,  $\mu 1$  et  $\beta 1$  continuent à interagir en l'absence de  $\gamma$  et  $\sigma 1$  et réciproquement. Enfin,  $\gamma$  et  $\sigma 1$  localisent toujours faiblement au TGN et/ou aux endosomes en l'absence de  $\mu 1$  (Ma et al., 2009). Ces données indiquent que la perte d'une sous-unité du complexe AP-1 n'abolit pas complètement la fonction des autres sous-unités, et suggère l'existence de deux hémicomplexes  $\beta 1/\mu 1$  et  $\gamma/\sigma 1$  accomplissant partiellement la fonction de l'hétérotétramère entier. Leur mode d'action et d'éventuelles fonctions supplémentaires, indépendantes de celles de l'hétérotétramère n'ont pas été investigués.

La formation d'hémicomplexes fonctionnels n'est-elle qu'une particularité des levures, ou peut-elle aussi avoir lieu chez les métazoaires ? La seule mention des hémicomplexes chez les métazoaires n'est longtemps venue que d'études *in vitro*, montrant que des hémicomplexes de mammifères  $\beta 1/\mu 1$  et  $\gamma/\sigma 1$  (et leurs paralogues du complexe AP2,  $\beta 2/\mu 2$  et  $\alpha/\sigma 2$ ) purifiés sont capables d'interagir avec des signaux de tri différents (Doray et al., 2007), ne démontrant en rien leur existence *in vivo*. Ce n'est que récemment que l'existence d'hémicomplexes fonctionnels d'AP-2 a été démontrée chez *C. elegans* (Gu et al., 2013). Le contexte de cette découverte est très similaire à celui de la découverte des hémicomplexes AP-1 chez les levures : les perte de fonction (supposées complètes) des sous-unité  $\mu 2$  (Gu et al., 2008) ou  $\alpha$  (Gu et al., 2013) chez *C. elegans* sont viables (contrairement à *D. melanogaster* où  $\alpha$  est essentielle au développement, Gonzalez-Gaitan & Jackle, 1997), et donnent des phénotypes qualitativement similaires mais quantitativement différents (Tableau 2 page 96). Ces

observations ont poussé les auteurs à observer ces phénotypes dans des doubles mutants  $\mu 2/\alpha$ . Les doubles mutants présentent des phénotypes beaucoup plus fréquents et/ou graves que les simples (Tableau 2 page 96), suggérant que certaines fonctionnalités du complexe AP-2 sont toujours assurées dans les simples mutants  $\alpha$  et  $\mu 2$ . Les auteurs montrent additionally que dans les mutants  $\alpha$ , bien qu'à des niveaux réduits,  $\beta 2$  et  $\mu 2$  localisent toujours aux membranes, de même pour  $\alpha$  et  $\sigma 2$  dans les mutants  $\mu 2$ , et enfin que les mutants  $\mu 2$  mais pas  $\alpha$  présentent un défaut d'internalisation d'un cargo contenant un signal d'endocytose Tyrosine, alors que les mutants  $\alpha$  présentent un défaut plus grave que les mutants  $\mu 2$  pour l'internalisation d'un cargo à signal Di-Leucine. Ce dernier résultat est cohérent avec les préférences de cargos présentées par les hémicomplexes de mammifères *in vitro* (Doray et al., 2007).

Même si les données concernant la sévérité des phénotypes selon le ou les hémicomplexes sont difficilement critiquables, il est toutefois prudent de noter que les localisations des sous-unités d'APs en l'absence d'autres sous-unités ont été déterminées à l'aide de versions taguées qui peuvent différer des protéines endogènes (e.g. pour  $\mu 1A$  et  $\mu 1B$ , voir page 38).

Je conclus de ces observations qu'affecter une seule sous-unité d'un complexe AP n'abolit pas forcément la fonction de tout le complexe. Est-ce aussi le cas chez la Drosophile ? Un résultat encore à étayer indique que ce pourrait être le cas pour AP-2 : la sous-unité  $\alpha$  localise toujours à la membrane plasmique en l'absence de  $\mu 2$  (page 63). Pour AP-1, des mutations considérées null des sous-unités  $\mu 1$  et  $\gamma$  donnent des phénotypes qualitativement similaires : dépigmentation de la cuticule, gain de fonction de la voie Notch, multinucléation des cellules nourricières, élargissement des endosomes Rab11-positifs. De manière intéressante, certains de ces phénotypes sont quantitativement différents entre ces deux mutants : à partir du stade 9 de l'ovogénèse, la perte de fonction de  $\mu 1$  induit une multinucléation dans 95% des cas, alors que je n'ai observé de multinucléation de cellule nourricière que dans 1/6 chambres d'œufs dans les mutants  $\gamma$  à ces stades. Des observations préliminaires indiquent aussi que le phénotype d'élargissement des endosomes de recyclage est plus sévère dans les mutants  $\mu 1$  que dans les mutants  $\gamma$  mais restent à confirmer. Ces observations suggèrent fortement mais ne prouvent pas l'existence d'hémicomplexes AP-1 chez la Drosophile : les différences quantitatives entre les deux mutants pourraient s'expliquer par une perte de fonction seulement partielle ou par exemple un effet dominant négatif de l'un ou l'autre de ces mutants. Cette question ne pourra être tranchée qu'en observant la gravité ou la fréquence de ces phénotypes (y compris sur les gains de fonctions de la voie Noch, qui affectent de 10 à

17% des cellules en fonction de la sous-unité affectée ou la technique employée, Benhra et al., 2011) dans des situations génétiques affectant à la fois les deux hémicomplexes potentiels  $\beta 1/\mu 1$  et  $\gamma/\sigma 1$  par rapport à un seul d'entre eux. Je conclurai sur cette partie en ajoutant qu'à ma connaissance, en dehors des travaux chez *C. elegans* et les levures que j'ai cités dans cette partie, cette méthode n'a pas été appliquée à l'étude des complexes APs et donc que l'existence ou l'inexistence d'hémicomplexe pour n'importe quel autre AP dans n'importe quel autre modèle reste à prouver.

|                        | Phénotype   |   |
|------------------------|---|---|
| <i>S. cerevisiae</i>   | Croissance ralentie                                     | $\Delta\beta 1/\mu 1/\gamma/\sigma 1 = \Delta\beta 1 = \Delta\mu 1 > \Delta\gamma = \Delta\sigma 1$                                 |
|                        | Défaut de tri de CPY                                    | $\Delta\beta 1/\mu 1/\gamma/\sigma 1 = \Delta\beta 1 > \Delta\mu 1 > \Delta\gamma = \Delta\sigma 1$                                 |
| <i>S. pombe</i>        | Croissance sensible à la température et aux drogues     | $\Delta\beta 1/\gamma = \Delta\beta 1/\sigma 1 > \Delta\beta 1 = \Delta\mu 1 = \Delta\beta 1/\mu 1 > \Delta\gamma = \Delta\sigma 1$ |
| <i>C. elegans</i>      | Létalité embryonnaire                                   | $\text{null } \alpha/\mu 2 \text{ (95\%)} > \text{null } \mu 2 \text{ (6\%)} > \text{null } \alpha \text{ (2\%)}$                   |
|                        | Réduction du nombre de vésicules synaptiques            | $\text{null } \alpha/\mu 2 \text{ (-70\%)} > \text{null } \mu 2 = \text{null } \alpha \text{ (-30\%)}$                              |
|                        | Protrusions de cuticule sur les côtés de la tête        | $\text{null } \alpha \text{ (30\%)} > \text{null } \mu 2 \text{ (5\%)}$   |
|                        | Internalisation de cargo à signal Di-Leucine            | $\text{null } \alpha > \text{null } \mu 2$  |
|                        | Internalisation de cargo à signal Tyrosine              | $\text{null } \mu 2 > \text{null } \alpha = \text{contrôle}$  |
| <i>D. melanogaster</i> | Multinucléation de cellules nourricières                | $AP-47^{SHE11} > AP-1\gamma^B$  |
|                        | Endosomes Rab11 élargis dans le cyste germinale femelle | $AP-47^{SHE11} > AP-1\gamma^B$ (à confirmer)  |

**Tableau 2.** Phénotypes synthétiques entre sous-unités de complexes AP. Les sous-unités séparées par des / sont des pertes de fonction multiples.

### *Adaptation cellulaire et trafic membranaire.*

Qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes, unicellulaires ou multicellulaires, les êtres vivants ont la faculté de s'adapter dans une certaine mesure à des changements de conditions extérieures, par exemple de température, de pH ou de salinité. Cette adaptabilité ne s'arrête pas là : les êtres vivants peuvent s'adapter dans certains cas à la perte de fonction d'un gène provoquant l'arrêt d'une fonction cellulaire donnée, en mettant progressivement en place un système pour remplacer cette fonction. La faculté des cellules à s'adapter à la perte de fonction d'AP-1 a été démontrée chez *S. cerevisiae*. L'utilisation d'un mutant thermosensible

de la clathrine permet d'inactiver immédiatement sa fonction en plaçant les levures à une température restrictive de 37°C. Cette perte de fonction s'accompagne immédiatement d'un défaut du trafic intracellulaire de CPY. Au bout d'environ trois heures à cette température restrictive, ce défaut de trafic de CPY (mais pas d'autres cargos) n'est plus apparent, indiquant que la cellule a mis en place un système compensant partiellement la perte de fonction de la clathrine (Seeger & Payne, 1992). Or, dans des doubles mutants portant la mutation thermosensible de la clathrine et délétion de la sous-unité  $\beta 1$  d'AP-1, les levures présentent un défaut initial de tri de CPY beaucoup plus réduit juste après avoir été placées à la température restrictive, indiquant que la perte de fonction d'AP-1 avait déjà déclenché la mise en place du système de compensation de la perte de fonction de la clathrine (Rad et al., 1995). Une nouvelle technique d'inactivation rapide, le Knocksideways, a permis de cibler directement AP-1 plutôt que la clathrine et amène à la même conclusion en cellule HeLa : la cellule est capable de mettre en place un système compensant partiellement la fonction d'AP-1 (voir page 15).

Les méthodes de déplétion par RNAi, qui peuvent prendre des jours, ou même l'utilisation de mutants conditionnels classiquement utilisés en analyse clonale chez la Drosophile, dont la rapidité d'action dépend des demi-vies des ARNm et des protéines ciblés, laissent aux cellules le temps de mettre en place ces systèmes compensatoires et ne sont donc pas adaptées à l'étude de ces systèmes. Les techniques d'inactivation rapide faisant appel à des drogues inhibant spécifiquement une protéine ou à des mutations thermosensibles ne sont applicables qu'à très peu de gènes. De nouvelles techniques comme le Knocksideways sont théoriquement applicables à n'importe quelle protéine à condition qu'elle puisse être taguée sans que sa fonction n'en soit affectée. Dans le cas du Knocksideways, c'est l'ajout d'une drogue dans le milieu qui déclenche la capture de la protéine ciblée. De nouveaux outils dits « optogénétiques », parce qu'ils sont activés par la lumière à une longueur d'onde donnée, pourront permettre de contrôler plus finement encore les inactivations rapides de protéines (e.g. Lee et al., 2014, Toettcher et al., 2013 pour revue). Bien que très efficaces, ces techniques requièrent la déplétion de la protéine endogène et l'expression de plusieurs transgènes. Une technique appelée DegradFP permet la dégradation d'une protéine taguée GFP en quelques heures (en moyenne 90% en 2,5 heures, Caussinus et al., 2011). Bien qu'elle soit plus lente que le Knocksideways, elle peut être utilisée très facilement pour les centaines de gènes déjà tagués GFP par la technique de Protein Trap disponibles chez la Drosophile et le poisson zèbre. Enfin, une collection d'allèles Knock-in de protéines Rab conditionnellement inactivables en



quelques heures est en préparation chez la Drosophile dans le laboratoire de Susan Eaton et participera certainement aussi grandement à une meilleure compréhension du trafic membranaire.

## Références bibliographiques

- Abazeed, M. E., & Fuller, R. S. (2008). Yeast Golgi-localized,  $\gamma$ -Ear-containing, ADP-Ribosylation Factor-binding Proteins Are but Adaptor Protein-1 Is Not Required for Cell-free Transport of Membrane Proteins from the Trans-Golgi Network to the Prevacuolar Compartment. *Molecular Biology of the Cell*, 19(11), 4826-4836.
- Abe, K., & Takeichi, M. (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(1), 13-19.
- Abrami, L., Bischofberger, M., Kunz, B., Groux, R., Goot, F. G., & Young, J. A. (2010). Endocytosis of the Anthrax Toxin Is Mediated by Clathrin, Actin and Unconventional Adaptors. *PLoS Pathogens*, 6(3), e1000792.
- Ahle, S., Mann, A., Eichelsbacher, U., & Ungewickell, E. (1988). Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. *Ahle*, 7(4), 919-29.
- Airoidi, S. J., Mclean, P. F., Shimada, Y., & Cooley, L. (2011). Intercellular protein movement in syncytial Drosophila follicle cells. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 124(23), 4077-4086.
- Ang, A., Taguchi, T., Francis, S., Fölsch, H., Murrells, L., Pypaert, M., et al. (2004). Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *The Journal of Cell Biology*, 167(3), 531-543.
- Anitei, M., Stange, C., Parshina, I., Baust, T., Schenck, A., Raposo, G., et al. (2010). Protein complexes containing CYFIP/Sra/PIR121 coordinate Arf1 and Rac1 signalling during clathrin-AP-1-coated carrier biogenesis at the TGN. *Nature Cell Biology*, 12(4), 330-340.
- Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F., & Knust, E. (2001). Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature*, 414(6864), 638-643.
- Bae, Y., Qin, H., Knobel, K., Hu, J., Rosenbaum, J., & Barr, M. (2006). General and cell-type specific mechanisms target TRPP2/PKD-2 to cilia. *Development*, 133(19), 3859-3870.
- Barman, S., Avalos, R., Sanderson, C., & Nayak, D. (2000). Analysis of the Transmembrane Domain of Influenza Virus Neuraminidase, a Type II Transmembrane Glycoprotein, for Apical Sorting and Raft Association. *Journal of Virology*, 74(14), 6538-6545.
- Benhra, N., Lallet, S., Cotton, M., Le Bras, S., Dussert, A., & Le Borgne, R. (2011). AP-1 Controls the Trafficking of Notch and Sanpodo toward E-Cadherin Junctions in Sensory Organ Precursors. *Current Biology*, 21(1), 87-95.
- Bhat, M. A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K., Choi, K., & Bellen, H. J. (1999). Discs Lost, a Novel Multi-PDZ Domain Protein, Establishes and Maintains Epithelial Polarity. *Cell*, 96(6), 833-845.
- Bilder, D., & Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature*, 406, 676-80.
- Bilder, D., Li, M., & Perrimon, N. (2000). Cooperative Regulation of Cell Polarity and Growth by Drosophila Tumor Suppressors. *Science*, 289(5476), 113-116.
- Bilder, D., Schober, M., & Perrimon, N. (2002). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nature Cell Biology*, 5(1), 53-58.
- Blagoveshchenskaya, A. D., Hewitt, E. W., & Cutler, D. F. (1999). Di-Leucine Signals Mediate Targeting of Tyrosinase and Synaptotagmin to Synaptic-like Microvesicles within PC12 Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 10(11), 3979-3990.
- Blankenship, J. T., Fuller, M. T., & Zallen, J. A. (2007). The Drosophila Homolog Of The Exo84 Exocyst Subunit Promotes Apical Epithelial Identity. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 120(17), 3099-3110.
- Boehm, M., & Bonifacino, J. S. (2001). Adaptins. The Final Recount. *Molecular Biology of the Cell*, 12(10), 2907-2920.
- Bonifacino, J., & Glick, B. (2004). The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell*, 116(2), 153-166.
- Borck, G., Munnich, A., Colleaux, L., Benmerah, A., Brunelle, F., Desguerre, I., et al. (2008). Clinical, cellular, and neuropathological consequences of AP1S2 mutations: further delineation of a recognizable X-linked mental retardation syndrome. *Human Mutation*, 29(7), 966-974.
- Bogard, N., Lan, L., Xu, J., & Cohen, R. S. (2007). Rab11 maintains connections between germline stem cells and niche cells in the Drosophila ovary. *Development*, 134(19), 3413-3418.
- Braun, V., Deschamps, C., Raposo, G., Benaroch, P., Benmerah, A., Chavrier, P., et al. (2007). AP-1 and ARF1 Control Endosomal Dynamics at Sites of FcR mediated Phagocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 18(12), 4921-4931.
- Bray, D., Heath, J., & Moss, D. (1986). The Membrane-Associated 'Cortex' of Animal Cells: its Structure and Mechanical Properties. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 1986(Supplement 4), 71-88.

- Brown, F. C., Schindelhaim, C. H., & Pfeffer, S. R. (2011). GCC185 plays independent roles in Golgi structure maintenance and AP-1-mediated vesicle tethering. *The Journal of Cell Biology*, 194(5), 779-787.
- Brown, P. S., Wang, E., Aroeti, B., Chapin, S. J., Mostov, K. E., & Dunn, K. W. (2000). Definition of Distinct Compartments in Polarized Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cells for Membrane-Volume Sorting, Polarized Sorting and Apical Recycling. *Traffic*, 1(2), 124-140.
- Burgess, J., Kramer, H., Brill, J. A., Le Borgne, R., Chang, H. C., Boulianne, G. L., et al. (2011). AP-1 and clathrin are essential for secretory granule biogenesis in *Drosophila*. *Molecular Biology of the Cell*, 22(12), 2094-2105.
- Burton, K. A., & Berg, C. (1997). Type II regulatory subunits are not required for the anchoring-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> channel activity by cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(20), 11067-11072.
- Cai, D., Chen, S., Prasad, M., He, L., Wang, X., Choismel-Cadamuro, V., et al. (2014). Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell*, 157(5), 1146-59.
- Calvo, P., Frank, D., Bieler, B., Berson, J., & Marks, M. (1999). A Cytoplasmic Sequence in Human Tyrosinase Defines a Second Class of Di-leucine-based Sorting Signals for Late Endosomal and Lysosomal Delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 274(18), 12780-12789.
- Camus, G., Berlioz-Torrent, C., Bertrand, E., Schu, P., Cazeville, C., Begon-Pescia, C., et al. (2007). The Clathrin Adaptor Complex AP-1 Binds HIV-1 and MLV Gag and Facilitates Their Budding. *Molecular Biology of the Cell*, 18(8), 3193-3203.
- Caussinus, E., Kanca, O., & Affolter, M. (2011). Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(1), 117-121.
- Chi, S., Cao, H., Chen, J., & Mcniven, M. A. (2008). Eps15 Mediates Vesicle Trafficking from the trans-Golgi Network via an Interaction with the Clathrin Adaptor AP-1. *Molecular Biology of the Cell*, 19(8), 3564-3575.
- Chiasson, C. M., Wittich, K. B., Vincent, P. A., Faundez, V., & Kowalczyk, A. P. (2009). p120-Catenin Inhibits VE-Cadherin Internalization through a Rho-independent Mechanism. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), 1970-1980.
- Chuang, J., Zhao, Y., & Sung, C. (2007). SARA-Regulated Vesicular Targeting Underlies Formation of the Light-Sensing Organelle in Mammalian Rods. *Cell*, 130(3), 535-547.
- Classen, A., Anderson, K. I., Marois, E., & Eaton, S. (2005). Hexagonal Packing of *Drosophila* Wing Epithelial Cells by the Planar Cell Polarity Pathway. *Developmental Cell*, 9(6), 805-817.
- Claret, S., Jouette, J., Benoit, B., Legent, K., & Guichet, A. (2014). PI(4,5)P<sub>2</sub> Produced by the PI4P5K SKTL Controls Apical Size by Tethering PAR-3 in *Drosophila* Epithelial Cells. *Curr Biol*, 24(10), 1071-9.
- Clemens-Grisham, R., Kindt, K., Finger-Baier, K., Schmid, B., Nicolson, T., & Riley, B. (2013). Mutations in ap1b1 Cause Mistargeting of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Pump in Sensory Hair Cells. *PLoS ONE*, 8(4), e60866.
- Cooley, L., Verheyen, E., & Ayers, K. (1992). chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell*, 69(1), 173-184.
- Costaguta, G., Stefan, C. J., Bensen, E. S., Emr, S. D., & Payne, G. S. (2001). Yeast Gga Coat Proteins Function with Clathrin in Golgi to Endosome Transport. *Molecular Biology of the Cell*, 12(6), 1885-1896.
- Cotton, M., Benhra, N., & LeÂ Borgne, R. (2013). Numb Inhibits the Recycling of Sanpodo in *Drosophila* Sensory Organ Precursor. *Current Biology*, 23(7), 581-587.
- Coutelis, J., & Ephrussi, A. (2007). Rab6 mediates membrane organization and determinant localization during *Drosophila* oogenesis. *Development*, 134(7), 1419-1430.
- Couturier, L., Mazouni, K., & Schweisguth, F. (2013). Numb Localizes at Endosomes and Controls the Endosomal Sorting of Notch after Asymmetric Division in *Drosophila*. *Current Biology*, 23(7), 588-593.
- Cox, D. N., Seyfried, S., Jan, L., & Jan, Y. (2001). Bazooka and atypical protein kinase C are required to regulate oocyte differentiation in the *Drosophila* ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25), 14475-14480.
- Cresawn, K. O., Potter, B. A., Oztan, A., Guerriero, C. J., Ihrke, G., Goldenring, J. R., et al. (2007). Differential involvement of endocytic compartments in the biosynthetic traffic of apical proteins. *The EMBO Journal*, 26(16), 3737-3748.
- Crump, C., Xiang, Y., Thomas, L., Gu, F., Austin, C., Tooze, S., et al. (2001). PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic. *The EMBO Journal*, 20(9), 2191-2201.
- Deborde, S., Perret, E., Gravotta, D., Deora, A., Salvarezza, S., Schreiner, R., et al. (2008). Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature*, 452(7188), 719-723.
- Delevoe, C., Marks, M. S., Raposo, G., Salamero, J., Verkleij, A. J., Geerts, W. J., et al. (2009). AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 187(2), 247-264.
- Desai, R., Sarpal, R., Ishiyama, N., Pellikka, M., Ikura, M., & Tepass, U. (2013). Monomeric  $\beta$ -catenin links cadherin to the actin cytoskeleton. *Nature Cell Biology*, 15(3), 261-273.

- Desclozeaux, M., Venturato, J., Wylie, F. G., Kay, J. G., Joseph, S. R., Le, H. T., et al. (2008). Active Rab11 and functional recycling endosome are required for E-cadherin trafficking and lumen formation during epithelial morphogenesis. *AJP: Cell Physiology*, 295(2), C545-C556.
- Doerflinger, H., Vogt, N., Torres, I. L., Mirouse, V., Koch, I., Nusslein-Volhard, C., et al. (2010). Bazooka is required for polarisation of the Drosophila anterior-posterior axis. *Development*, 137(10), 1765-1773.
- Donaldson, J. G., & Jackson, C. L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(6), 362-375.
- Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H., & Kornfeld, S. (2002). Cooperation of GGAs and AP-1 in Packaging MPRs at the Trans-Golgi Network. *Science*, 297(5587), 1700-1703.
- Doray, B., Lee, I., Knisely, J., Bu, G., & Kornfeld, S. (2007). The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 Hemicomplexes of Clathrin Adaptors AP-1 and AP-2 Harbor the Dileucine Recognition Site. *Molecular Biology of the Cell*, 18(5), 1887-1896.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., & Weis, W. I. (2005).  $\alpha$ -Catenin Is a Molecular Switch that Binds E-Cadherin- $\beta$ -Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly. *Cell*, 123(5), 903-915.
- Duchek, P., Somogyi, K., J  kely, G., Beccari, S., & Rorth, P. (2001). Guidance of Cell Migration by the Drosophila PDGF/VEGF Receptor. *Cell*, 107(1), 17-26.
- Dwyer, N. D., Adler, C. E., Crump, J. G., L'Etoile, N. D., & Bargmann, C. I. (2001). Polarized Dendritic Transport and the AP-1  $\beta$ 1 Clathrin Adaptor UNC-101 Localize Odorant Receptors to Olfactory Cilia. *Neuron*, 31(2), 277-287.
- Erickson, J., Zhang, C., Kahn, R., Evans, T., & Cerione, R. (1996). Mammalian Cdc42 Is a Brefeldin A-sensitive Component of the Golgi Apparatus. *Journal of Biological Chemistry*, 271(43), 26850-26854.
- Eskelinen, E., Meyer, C., Ohno, H., Figura, K. v., & Schu, P. (2002). The polarized epithelia-specific micro1B-adaptin complements micro1A-deficiency in fibroblasts. *EMBO Reports*, 3(5), 471-477.
- Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42 - the centre of polarity. *Journal of Cell Science*, 117(8), 1291-1300.
- Farr, G. A., Hull, M., Mellman, I., & Caplan, M. J. (2009). Membrane proteins follow multiple pathways to the basolateral cell surface in polarized epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 186(2), 269-282.
- Far  as, G., Cuitino, L., Guo, X., Ren, X., Jarnik, M., Mattera, R., et al. (2012). Signal-Mediated, AP-1/Clathrin-Dependent Sorting of Transmembrane Receptors to the Somatodendritic Domain of Hippocampal Neurons. *Neuron*, 75(5), 810-823.
- Fernandez, G. E., & Payne, G. (2006). Laa1p, a Conserved AP-1 Accessory Protein Important for AP-1 Localization in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 17(7), 3304-3317.
- Ferrari, A., Veligodskiy, A., Berge, U., Lucas, M. S., & Kroschewski, R. (2008). ROCK-mediated contractility, tight junctions and channels contribute to the conversion of a preapical patch into apical surface during isochoric lumen initiation. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 121(21), 3649-3663.
- Field, C., & Alberts, B. (1995). Anillin, a contractile ring protein that cycles from the nucleus to the cell cortex. *The Journal of Cell Biology*, 131(1), 165-178.
- Fields, I. C., King, S. M., Shteyn, E., Kang, R. S., & Folsch, H. (2010). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate Localization in Recycling Endosomes Is Necessary for AP-1B-dependent Sorting in Polarized Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 21(1), 95-105.
- Fletcher, G., Lucas, E., Brain, R., Tournier, A., & Thompson, B. (2012). Positive Feedback and Mutual Antagonism Combine to Polarize Crumbs in the Drosophila Follicle Cell Epithelium. *Current Biology*, 22(12), 1116-1122.
- Folsch, H., Pypaert, M., Schu, P., & Mellman, I. (2001). Distribution and Function of AP-1 Clathrin Adaptor Complexes in Polarized Epithelial Cells. *The Journal of Cell Biology*, 152(3), 595-606.
- Folsch, H., Pypaert, M., Maday, S., Pelletier, L., & Mellman, I. (2003). The AP-1A and AP-1B clathrin adaptor complexes define biochemically and functionally distinct membrane domains. *The Journal of Cell Biology*, 163(2), 351-362.
- Foote, C., & Nothwehr, S. (2006). The clathrin adaptor complex 1 directly binds to a sorting signal in Ste13p to reduce the rate of its trafficking to the late endosome of yeast. *The Journal of Cell Biology*, 173(4), 615-626.
- Foss, S. M., Li, H., Santos, M. S., Edwards, R. H., & Voglmaier, S. M. (2013). Multiple Dileucine-like Motifs Direct VGLUT1 Trafficking. *Journal of Neuroscience*, 33(26), 10647-10660.
- Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Kirchhausen, T., et al. (2004). Molecular Model For A Complete Clathrin Lattice From Electron Cryomicroscopy. *Nature*, 432(7017), 573-579.
- Franz, A., & Riechmann, V. (2010). Stepwise polarisation of the Drosophila follicular epithelium. *Developmental Biology*, 338(2), 136-147.
- Friend, D. S. (1967). Functions Of Coated Vesicles During Protein Absorption In The Rat Vas Deferens. *The Journal of Cell Biology*, 35(2), 357-376.

- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E., Behrens, J., et al. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature Cell Biology*, 4(3), 222-231.
- Fulga, T. A., & Rorth, P. (2002). Invasive cell migration is initiated by guided growth of long cellular extensions. *Nature Cell Biology*, 4(9), 715-719.
- Fölsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J. S., & Mellman, I. (1999). A Novel Clathrin Adaptor Complex Mediates Basolateral Targeting in Polarized Epithelial Cells. *Cell*, 99(2), 189-198.
- Gassama-Diagne, A., Yu, W., Beest, M. T., Martin-Belmonte, F., Kierbel, A., Engel, J., et al. (2006). Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nature Cell Biology*, 8(9), 963-970.
- Gaidarov, I., & Keen, J. (1999). Phosphoinositide-AP-2 Interactions Required for Targeting to Plasma Membrane Clathrin-coated Pits. *The Journal of Cell Biology*, 146(4), 755-764.
- Gallusser, A., & Kirchhausen, T. (1993). The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *EMBO J*, 12(13), 5237-44.
- Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J., & Baum, B. (2008). Cdc42, Par6, and aPKC Regulate Arp2/3-Mediated Endocytosis to Control Local Adherens Junction Stability. *Current Biology*, 18(21), 1631-1638.
- Ghosh, P., & Kornfeld, S. (2003). AP-1 binding to sorting signals and release from clathrin-coated vesicles is regulated by phosphorylation. *The Journal of Cell Biology*, 160(5), 699-708.
- Godi, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Tullio, G. D., Iurisci, C., et al. (1999). ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates . *Nature*, 1(5), 280-7.
- Godt, D., & Tepass, U. (1998). Drosophila oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion. *Nature*, 395(6700), 387-91.
- Gokhale, N. A. (2013). Membrane phosphoinositides and protein-membrane interactions. *Amino Acids*, 45(4), 751-754.
- Goldstein, B., & Macara, I. G. (2007). The PAR Proteins: Fundamental Players In Animal Cell Polarization. *Developmental Cell*, 13(5), 609-622.
- González-Gaitán, M., & Jäckle, H. (1997). Role of Drosophila alpha-adaptin in presynaptic vesicle recycling. *Cell*, 88(6), 767-76.
- Grammont, M., & Irvine, K. (2001). fringe and Notch specify polar cell fate during Drosophila oogenesis. *Development*, 128(12), 2243-53.
- Grammont, M. (2007). Adherens junction remodeling by the Notch pathway in Drosophila melanogaster oogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 177(1), 139-150.
- Gravotta, D., Deora, A., Perret, E., Oyanadel, C., Soza, A., Schreiner, R., et al. (2007). AP1B sorts basolateral proteins in recycling and biosynthetic routes of MDCK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), 1564-1569.
- Gravotta, D., Carvajal-Gonzalez, J., Mattera, R., Deborde, S., Banfelder, J., Bonifacino, J., et al. (2012). The Clathrin Adaptor AP-1A Mediates Basolateral Polarity. *Developmental Cell*, 22(4), 811-823.
- Gu, M., Liu, Q., Watanabe, S., Sun, L., Hollopeter, G., Grant, B. D., et al. (2013). AP2 hemicomplexes contribute independently to synaptic vesicle endocytosis. *eLife*, 2(0), e00190-e00190.
- Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., & Novick, P. (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *The EMBO Journal*, 18(4), 1071-1080.
- Guo, X., Mattera, R., Ren, X., Chen, Y., Retamal, C., Gonzalez, A., et al. (2013). The Adaptor Protein-1A/41B Subunit Expands the Repertoire of Basolateral Sorting Signal Recognition in Epithelial Cells. *Developmental Cell*, 27(3), 353-366.
- Guo, Y., Zanetti, G., & Schekman, R. (2013). A novel GTP-binding protein-adaptor protein complex responsible for export of Vangl2 from the trans Golgi network. *eLife*, 2(0), e00160-e00160.
- Han, S., & Yap, A. S. (2013). An  $\alpha$ -catenin déjà-vu. *Nature Cell Biology*, 15(3), 238-239.
- Haglund, K., Nezis, I., & Stenmark, H. (2011). Structure and functions of stable intercellular bridges formed by incomplete cytokinesis during development. *Communicative & integrative biology*, 4(1), 1-9.
- Haigo, S. L., & Bilder, D. (2011). Global Tissue Revolutions in a Morphogenetic Movement Controlling Elongation. *Science*, 331(6020), 1071-1074.
- Harris, J., & Peiffer, M. (2004). Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in Drosophila. *The Journal of Cell Biology*, 167(1), 135-147.
- Harris, J., & Peiffer, M. (2005). The Positioning And Segregation Of Apical Cues During Epithelial Polarity Establishment In Drosophila. *The Journal of Cell Biology*, 170(5), 813-823.

- Harris, K. P., & Tepass, U. (2008). Cdc42 and Par proteins stabilize dynamic adherens junctions in the *Drosophila* neuroectoderm through regulation of apical endocytosis. *The Journal of Cell Biology*, 183(6), 1129-1143.
- Hase, K., Yonemura, S., Shioda, N., Sugihara, K., Ohmae, M., Nakatsu, F., et al. (2013). AP-1B<sup>Δ</sup>-Mediated Protein Sorting Regulates Polarity and Proliferation of Intestinal Epithelial Cells in Mice. *Gastroenterology*, 145(3), 625-635.
- Heider, M. R., & Munson, M. (2012). Exorcising the Exocyst Complex. *Traffic*, 13(7), 898-907.
- Heldwein, E. E. (2004). Crystal structure of the clathrin adaptor protein 1 core. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(39), 14108-14113.
- Hirst, J., Lindsay, M. R., & Robinson, M. S. (2001). Golgi-localized, gamma-Ear-containing, ADP-Ribosylation Factor-binding Proteins: Roles of the Different Domains and Comparison with AP-1 and Clathrin. *Molecular Biology of the Cell*, 12(11), 3573-3588.
- Hirst, J., Borner, G., Harbour, M., & Robinson, M. (2005). The Aftiphilin/p200/γ-Synergin Complex. *Molecular Biology of the Cell*, 16(5), 2554-2565.
- Hirst, J., Sahlender, D. A., Choma, M., Sinka, R., Harbour, M. E., Parkinson, M., et al. (2009). Spatial and Functional Relationship of GGAs and AP-1 in HeLa Cells. *Traffic*, 10(11), 1696-1710.
- Hirst, J., Barlow, L. D., Francisco, G. C., Sahlender, D. A., Seaman, M. N., Dacks, J. B., et al. (2011). The Fifth Adaptor Protein Complex. *PLoS Biology*, 9(10), e1001170.
- Hirst, J., Borner, G., Antrobus, R., Peden, A., Hodson, N., Sahlender, D., et al. (2012). Distinct and Overlapping Roles for AP-1 and GGAs Revealed by the *Knocksideways* System. *Current Biology*, 22(18), 1711-1716.
- Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2001). *Drosophila* Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature*, 414(6864), 634-638.
- Huang, J., Zhou, W., Dong, W., Watson, A. M., & Hong, Y. (2009). Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(20), 8284-8289.
- Huber, L. A., Pimplikar, S., Parton, R., Virta, H., Zerial, M., & Simons, K. (1993). Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *The Journal of Cell Biology*, 123(1), 35-45.
- Hudson, A. M., & Cooley, L. (2010). *Drosophila* Kelch functions with Cullin-3 to organize the ring canal actin cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology*, 188(1), 29-37.
- Huelsmann, S., Ylänne, J., & Brown, N. (2013). Filopodia-like Actin Cables Position Nuclei in Association with Perinuclear Actin in *Drosophila* Nurse Cells. *Developmental Cell*, 26(6), 604-615.
- Huynh, J., Petronczki, M., Knoblich, J. A., & Johnston, D. S. (2001). Bazooka and PAR-6 are required with PAR-1 for the maintenance of oocyte fate in *Drosophila*. *Current Biology*, 11(11), 901-906.
- Izumi, Y. (1998). An Atypical PKC Directly Associates and Colocalizes at the Epithelial Tight Junction with ASIP, a Mammalian Homologue of *Caenorhabditis elegans* Polarity Protein PAR-3. *The Journal of Cell Biology*, 143(1), 95-106.
- Janvier, K., Kato, Y., Boehm, M., Rose, J., Martina, J., Kim, B., et al. (2003). Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 γ-σ1 and AP-3 δ-σ3 hemicomplexes. *The Journal of Cell Biology*, 163(6), 1281-1290.
- Januschke, J., Nicolas, E., Compagnon, J., Formstecher, E., Goud, B., & Guichet, A. (2007). Rab6 and the secretory pathway affect oocyte polarity in *Drosophila*. *Development*, 134(19), 3419-3425.
- Kaido, M., Wada, H., Shindo, M., & Hayashi, S. (2009). Essential requirement for RING finger E3 ubiquitin ligase Hakai in early embryonic development of *Drosophila*. *Genes Cells*, 14(9), 1067-77.
- Kametaka, S., Sawada, N., Bonifacino, J. S., & Waguri, S. (2010). Functional characterization of protein-sorting machineries at the trans-Golgi network in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science*, 123(3), 460-471.
- Kametaka, S., Kametaka, A., Yonekura, S., Haruta, M., Takenoshita, S., Goto, S., et al. (2012). AP-1 clathrin adaptor and CG8538/Aftiphilin are involved in Notch signaling during eye development in *Drosophila melanogaster*. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 125(3), 634-648.
- Kaplan, O. I., Benmerah, A., Blacque, O. E., Setou, M., Martens, J. R., Jenkins, P., et al. (2010). The AP-1 clathrin adaptor facilitates cilium formation and functions with RAB-8 in *C. elegans* ciliary membrane transport. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 123(22), 3966-3977.
- Keen, J. H. (1987). Clathrin assembly proteins: affinity purification and a model for coat assembly. *The Journal of Cell Biology*, 105(5), 1989-1998.
- Keen, J. H., Willingham, M. C., & Pastan, I. H. (1979). Clathrin-coated vesicles: Isolation, dissociation and factor-dependent reassociation of clathrin baskets. *Cell*, 16(2), 303-312.
- Keller, P., Toomre, D., Diaz, E., White, J., & Simons, K. (2001). Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nature Cell Biology*, 3, 140-149.

- Kelso, R., Hudson, A., & Cooley, L. (2002). Drosophila Kelch regulates actin organization via Src64-dependent tyrosine phosphorylation. *The Journal of Cell Biology*, 156(4), 703-713.
- Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G., & Cheng, N. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell*, 52(3), 311-320.
- Keyel, P. A., Thieman, J. R., Roth, R., Erkan, E., Everett, E. T., Watkins, S. C., et al. (2008). The AP-2 Adaptor  $\hat{A}$  2 Appendage Scaffolds Alternate Cargo Endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 19(12), 5309-5326.
- Kim, S., & Ryan, T. (2009). Synaptic vesicle recycling at CNS synapses without AP-2. *Neuroscience*, 29, 3865-3874.
- Kinlough, C. L., McMahan, R., Poland, P., Bruns, J., Harkleroad, K., Strempel, R., et al. (2006). Recycling of MUC1 Is Dependent on Its Palmitoylation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(17), 12112-12122.
- Kita, A., Sugiura, R., Kuno, T., Shoji, H., He, Y., Deng, L., et al. (2004). Loss of Apm1, the  $\hat{A}$  1 Subunit of the Clathrin-Associated Adaptor-Protein-1 Complex, Causes Distinct Phenotypes and Synthetic Lethality with Calcineurin Deletion in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 15(6), 2920-2931.
- Klemm, R. W., Shevchenko, A., Simons, K., Proszynski, T. J., Ferguson, C., Robillard, Q. D., et al. (2009). Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network. *The Journal of Cell Biology*, 185(4), 601-612.
- Knight, A., Hughson, E., Hopkins, C. R., & Cutler, D. F. (1995). Membrane protein trafficking through the common apical endosome compartment of polarized Caco-2 cells. *Molecular Biology of the Cell*, 6(5), 597-610.
- Knuehl, C., Chen, C., Manalo, V., Hwang, P. K., Ota, N., & Brodsky, F. M. (2006). Novel Binding Sites on Clathrin and Adaptors Regulate Distinct Aspects of Coat Assembly. *Traffic*, 7(12), 1688-1700.
- Kobielak, A., Pasolli, H. A., & Fuchs, E. (2003). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nature Cell Biology*, 6(1), 21-30.
- Kramerova, I. A., & Kramerov, A. A. (1999). Mucinoprotein is a universal constituent of stable intercellular bridges in *Drosophila melanogaster* germ line and somatic cells. *Developmental Dynamics*, 216(4/5), 349-360.
- Kreitzer, G., Schmoranz, J., Low, S. H., Li, X., Gan, Y., Weimbs, T., et al. (2003). Three-dimensional analysis of post-Golgi carrier exocytosis in epithelial cells. *Nature Cell Biology*, 5(2), 126-136.
- Kroemker, M., Rüdiger, A., Jockusch, B., & Rüdiger, M. (1994). Intramolecular interactions in vinculin control  $\alpha$ -actinin binding to the vinculin head. *FEBS Letters*, 5, 259-262.
- Kuphal, S., Poser, I., Jobin, C., Hellerbrand, C., & Bosserhoff, A. K. (2004). Loss of E-cadherin leads to upregulation of NF $\hat{B}$  activity in malignant melanoma. *Oncogene*, 23(52), 8509-8519.
- Kuphal, S., & Bosserhoff, A. K. (2006). Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma. *Oncogene*, 25, 248-259.
- Lane, M., & Kalderon, D. (1995). Localization and functions of Protein Kinase A during *Drosophila* oogenesis. *Mechanisms of Development*, 49(3), 191-200.
- Langevin, J., Camonis, J., Schwarz, T., Murthy, M., Aresta, S., Sibarita, J., et al. (2005). *Drosophila* Exocyst Components Sec5, Sec6, and Sec15 Regulate DE-Cadherin Trafficking from Recycling Endosomes to the Plasma Membrane. *Developmental Cell*, 9(3), 365-376.
- Le Borgne, R., & Hoflack, B. (1997). Mannose 6-Phosphate Receptors Regulate the Formation of Clathrin-coated Vesicles in the TGN. *The Journal of Cell Biology*, 137(2), 335-345.
- Le Bras, S., Rondonino, C., Kriegel-Taki, G., Dussert, A., & Le Borgne, R. (2012). Genetic identification of intracellular trafficking regulators involved in Notch-dependent binary cell fate acquisition following asymmetric cell division. *Development*, 140(2), e208-e208.
- Le Bras, S., Rondonino, C., Kriegel-Taki, G., Dussert, A., & Le Borgne, R. (2012). Genetic identification of intracellular trafficking regulators involved in Notch-dependent binary cell fate acquisition following asymmetric cell division. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 125(20), 4886-4901.
- Lecuit, T., & Lenne, P. (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), 633-644.
- Le, T. L., Yap, A., & Stow, J. (1999). Recycling of E-Cadherin: A Potential Mechanism for Regulating Cadherin Dynamics. *The Journal of Cell Biology*, 146(1), 219-232.
- Lee, I., Doray, B., Govero, J., & Kornfeld, S. (2008). Binding of cargo sorting signals to AP-1 enhances its association with ADP ribosylation factor 1-GTP. *The Journal of Cell Biology*, 180(3), 467-472.
- Lee, S., Park, H., Kyung, T., Kim, N. Y., Kim, S., Kim, J., et al. (2014). Reversible protein inactivation by optogenetic trapping in cells. *Nature Methods*, 11, 633-636.
- Lefkir, Y., Malbouyres, M., Gotthardt, D., Ozinsky, A., Cornillon, S., Bruckert, F., et al. (2003). Involvement of the AP-1 Adaptor

Complex in Early Steps of Phagocytosis and Macropinocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 15(2), 861-869.

- Lefkir, Y., Chassey, B. d., Dubois, A., Bogdanovic, A., Brady, R., Destaing, O., et al. (2003). The AP-1 Clathrin-adaptor Is Required for Lysosomal Enzymes Sorting and Biogenesis of the Contractile Vacuole Complex in Dictyostelium Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 14(5), 1835-1851.
- Leibfried, A., Fricke, R., Morgan, M. J., Bogdan, S., & Bellaiche, Y. (2008). Drosophila Cip4 and WASp Define a Branch of the Cdc42-Par6-aPKC Pathway Regulating E-Cadherin Endocytosis. *Current Biology*, 18(21), 1639-1648.
- Levayer, R., Pelissier-Monier, A., & Lecuit, T. (2011). Spatial regulation of Dia and Myosin-II by RhoGEF2 controls initiation of E-cadherin endocytosis during epithelial morphogenesis. *Nature Cell Biology*, 13(6), 734-734.
- Ling, K., Bairstow, S. F., Carbonara, C., Turbin, D. A., Huntsman, D. G., & Anderson, R. A. (2007). Type I  $\hat{A}$  phosphatidylinositol phosphate kinase modulates adherens junction and E-cadherin trafficking via a direct interaction with mu1B adaptin. *The Journal of Cell Biology*, 176(3), 343-353.
- Lohia, M., Qin, Y., Macara, I. G., & Gottardi, C. (2012). The Scribble Polarity Protein Stabilizes E-Cadherin/p120-Catenin Binding and Blocks Retrieval of E-Cadherin to the Golgi. *PLoS ONE*, 7(11), e51130.
- Lopez-Schier, H., & Johnston, D. S. (2001). Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during Drosophila oogenesis. *GENES & DEVELOPMENT*, 15(11), 1393-1405.
- Lu, H., & Bilder, D. (2005). Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in Drosophila. *Nature Cell Biology*, 7(12), 1132-1139.
- Luan, S., Ilvarsonn, A. M., Eissenberg, J. C., & Johannes, L. (2012). The Unique GGA Clathrin Adaptor of Drosophila melanogaster Is Not Essential. *PLoS ONE*, 7(9), e45163.
- Lui-Roberts, W. W., Collinson, L., Hewlett, L., Michaux, G., & Cutler, D. (2005). An AP-1/clathrin coat plays a novel and essential role in forming the Weibel-Palade bodies of endothelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 170(4), 627-636.
- Lui-Roberts, W. W., Ferraro, F., Nightingale, T. D., & Cutler, D. F. (2008). Aftiphilin and  $\gamma$ -Synergisin Are Required for Secretagogue Sensitivity of Weibel-Palade Bodies in Endothelial Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 19(12), 5072-5081.
- Luton, F., Hexham, M. J., Zhang, M., & Mostov, K. E. (2009). Identification of a Cytoplasmic Signal for Apical Transcytosis. *Traffic*, 10(8), 1128-1142.
- Ma, Y., Takeuchi, M., Sugiura, R., Sio, S. O., & Kuno, T. (2009). Deletion mutants of AP-1 adaptin subunits display distinct phenotypes in fission yeast. *Genes to Cells*, 14(8), 1015-1028.
- Margeta, M. A., Wang, G. J., & Shen, K. (2009). Clathrin adaptor AP-1 complex excludes multiple postsynaptic receptors from axons in C. elegans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(5), 1632-1637.
- Maritzen, T., Schmidt, M. R., Kukhtina, V., Higman, V. A., Strauss, H., Volkmer, R., et al. (2010). A Novel Subtype of AP-1-binding Motif within the Palmitoylated trans-Golgi Network/Endosomal Accessory Protein Gadkin/ $\gamma$ -BAR. *Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 4074-4086.
- Marzolo, M., Yuseff, M. I., Retamal, C., Donoso, M., Ezquer, F., Farfán, P., et al. (2003). Differential Distribution of Low-Density Lipoprotein-Receptor-Related Protein (LRP) and Megalin in Polarized Epithelial Cells is Determined by Their Cytoplasmic Domains. *Traffic*, 4(4), 273-288.
- Mattera, R., Boehm, M., Chaudhuri, R., Prabhu, Y., & Bonifacio, J. S. (2011). Conservation and Diversification of Dileucine Signal Recognition by Adaptor Protein (AP) Complex Variants. *Journal of Biological Chemistry*, 286(3), 2022-2030.
- Mattera, R., Farias, G., Mardones, G., & Bonifacio, J. (2014). Co-assembly of Viral Envelope Glycoproteins Regulates. *PLoS Pathog*, 10(5), e1004107.
- McEwen, A., Maher, M., Mo, R., & Gottardi, C. (2014). E-cadherin phosphorylation occurs during its biosynthesis to promote its cell surface stability and adhesion. *Mol. Biol. Cell*, 25(16), 2365-2374.
- McNew, J., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R., Paz, K., Paumet, F., et al. (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature*, 407(6801), 153-159.
- McMahon, H. T., & Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, 438(7068), 590-596.
- Medigeshi, G. R., Krikunova, M., Radhakrishnan, K., Wenzel, D., Klingauf, J., & Schu, P. (2008). AP-1 Membrane-Cytoplasm Recycling Regulated by  $\hat{A}$ 1A-Adaptin. *Traffic*, 9(1), 121-132.
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E., Hamann, J., Saftig, P., et al. (2000).  $\hat{A}$ 1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *The EMBO Journal*, 19(10), 2193-2203.
- Meyer, D. M. (2005). Oligomerization and Dissociation of AP-1 Adaptors Are Regulated by Cargo Signals and by ArfGAP1-induced GTP Hydrolysis. *Molecular Biology of the Cell*, 16(10), 4745-4754.
- Miyashita, Y., & Ozawa, M. (2007). A dileucine motif in its cytoplasmic domain directs -catenin-uncoupled E-cadherin to the lysosome. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 120(24), 4395-4406.



- Montpetit, A., Cossette, P., Côté, S., Heyningen, V. V., Drapeau, P., Hudson, T. J., et al. (2008). Disruption of AP1S1, Causing a Novel Neurocutaneous Syndrome, Perturbs Development of the Skin and Spinal Cord. *PLoS Genetics*, 4(12), e1000296.
- Morais-De-Sa, E., Mirouse, V., & Johnston, D. S. (2010). aPKC Phosphorylation of Bazooka Defines the Apical/Lateral Border in *Drosophila* Epithelial Cells. *Cell*, 141(3), 509-523.
- Morawe, T., Honemann-Capito, M., Stein, W. V., & Wodarz, A. (2011). Loss of the extraproteasomal ubiquitin receptor Rings lost impairs ring canal growth in *Drosophila* oogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 193(1), 71-80.
- Morrison, H. A., Dionne, H., Rusten, T. E., Brech, A., Fisher, W. W., Pfeiffer, B. D., et al. (2008). Regulation of Early Endosomal Entry by the *Drosophila* Tumor Suppressors Rabenosyn and Vps45. *Molecular Biology of the Cell*, 19(10), 4167-4176.
- Murthy, M., & Schwarz, T. (2003). The exocyst component Sec5 is required for membrane traffic and polarity in the *Drosophila* ovary. *Development*, 131(2), 377-388.
- Murthy, M., Ranjan, R., Deneff, N., Higashi, M., Schupbach, T., & Schwarz, T. (2005). Sec6 mutations and the *Drosophila* exocyst complex. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 118(6), 1139-1150.
- Musch, A., Cohen, D., Kreitzer, G., & Rodriguez-Boulán, E. (2001). cdc42 regulates the exit of apical and basolateral proteins from the trans-Golgi network. *The EMBO Journal*, 20(9), 2171-2179.
- Nakagawa, T., Setou, M., Seog, D., Ogasawara, K., Dohmae, N., Takio, K., et al. (2000). A Novel Motor, KIF13A, Transports Mannose-6-Phosphate Receptor to Plasma Membrane through Direct Interaction with AP-1 Complex. *Cell*, 103(4), 569-581.
- Nanes, B. A., Chiasson-Mackenzie, C., Lowery, A. M., Ishiyama, N., Faundez, V., Ikura, M., et al. (2012). p120-catenin binding masks an endocytic signal conserved in classical cadherins. *The Journal of Cell Biology*, 199(2), 365-380.
- Nichols, S. A., Roberts, B. W., Richter, D. J., Fairclough, S. R., & King, N. (2012). Origin of metazoan cadherin diversity and the antiquity of the classical cadherin/Î-catenin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(32), 13046-13051.
- Nieman, M., Prudoff, R., Johnson, K., & Wheelock, M. (1999). N-Cadherin Promotes Motility in Human Breast Cancer Cells Regardless of their E-Cadherin Expression. *The Journal of Cell Biology*, 147(3), 631-644.
- Niewiadomska, P., Godt, D., & Tepass, U. (1999). DE-Cadherin Is Required for Intercellular Motility during *Drosophila* Oogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 144(3), 533-547.
- Nokes, R. L., Fields, I. C., Collins, R. N., & Folsch, H. (2008). Rab13 regulates membrane trafficking between TGN and recycling endosomes in polarized epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 182(5), 845-853.
- Noviello, C. M., Benichou, S., & Guatelli, J. C. (2008). Cooperative Binding of the Class I Major Histocompatibility Complex Cytoplasmic Domain and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef to the Endosomal AP-1 Complex via Its mu Subunit. *Journal of Virology*, 82(3), 1249-1258.
- Ohno, H., Kirchhausen, T., Gallusser, A., Saito, T., Miyatake, S., Rhee, I., et al. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science*, 269(5232), 1872-1875.
- Ohno, H., Aguilar, R., Yeh, D., Taura, D., Saito, T., & Bonifacino, J. (1998). The Medium Subunits of Adaptor Complexes Recognize Distinct but Overlapping Sets of Tyrosine-based Sorting Signals. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 25915-25921.
- Ohno, H., Shirasawa, T., Saito, T., Mellman, I., Foelsch, H., Aguilar, R. C., et al. (1999). Î41B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Letters*, 449(2-3), 215-220.
- Oliveira, P., Sanges, R., Huntsman, D., Stupka, E., & Oliveira, C. (2012). Characterization of the intronic portion of cadherin superfamily members, common cancer orchestrators. *European Journal of Human Genetics*, 20, 878-883.
- Ong, S., Foote, C., & Tan, C. (2010). Mutations of DMYPT cause over constriction of contractile rings and ring canals during *Drosophila* germline cyst formation. *Developmental Biology*, 346(2), 161-169.
- Owen, D., & Evans, P. (1998). A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals.. *Science*, 282, 1327-32.
- Pacquelet, A., Lin, L., & Rorth, P. (2003). Binding site for p120/delta-catenin is not required for *Drosophila* E-cadherin function in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 160(3), 313-319.
- Pagano, A., Prescianotto-Baschong, C., Crottet, P., & Spiess, M. (2004). In Vitro Formation of Recycling Vesicles from Endosomes Requires Adaptor Protein-1/Clathrin and Is Regulated by Rab4 and the Connector Rabaptin-5. *Molecular Biology of the Cell*, 15(11), 4990-5000.
- Page, L. J. (1995). Targeting signals and subunit interactions in coated vesicle adaptor complexes. *The Journal of Cell Biology*, 131(3), 619-630.
- Pearse, B. M., & Robinson, M. S. (1984). Purification and properties of 100-kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin.. *EMBO J*, 3(9), 1951-1957.
- Peden, A., Park, G., & Scheller, R. (2001). The Di-leucine Motif of Vesicle-associated Membrane Protein 4 Is Required for Its

Localization and AP-1 Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), 49183-49187.

- Perrin, L., Lacas-Gervais, S., Gilleron, J., Ceppo, F., Prodon, F., Benmerah, A., et al. (2013). Rab4b controls an early endosome sorting event by interacting with the  $\beta$ -subunit of the clathrin adaptor complex 1. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 126(21), 4950-4962.
- Phelan, J. P., Millson, S. H., Parker, P. J., Piper, P. W., & Cooke, F. T. (2006). Fab1p and AP-1 are required for trafficking of endogenously ubiquitinated cargoes to the vacuole lumen in *S. cerevisiae*. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 119(20), 4225-4234.
- Pilot, F., Philippe, J., Lemmers, C., & Lecuit, T. (2006). Spatial control of actin organization at adherens junctions by a synaptotagmin-like protein. *Nature*, 442(7102), 580-584.
- Pizarro-Cerdá, J., Payraastre, B., Wang, Y., Veiga, E., Yin, H. L., & Cossart, P. (2007). Type II phosphatidylinositol 4-kinases promote *Listeria monocytogenes* entry into target cells. *Cellular Microbiology*, 9(10), 2381-2390.
- Pocha, S., Wassmer, T., Niehage, C., Hoflack, B., & Knust, E. (2011). Retromer Controls Epithelial Cell Polarity by Trafficking the Apical Determinant Crumbs. *Current Biology*, 21(13), 1111-1117.
- Potter, B., Ihrke, G., Bruns, J., Weixel, K., & Weisz, O. (2003). Specific N-Glycans Direct Apical Delivery of Transmembrane, but Not Soluble or Glycosylphosphatidylinositol-anchored Forms of Endolyn in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3), 1407-1416.
- Potter, B., Hughey, R., & Weisz, O. (2005). Role of N- and O-glycans in polarized biosynthetic sorting. *AJP: Cell Physiology*, 290(1), C1-C10.
- Prasad, M., Jang, A. C., Starz-Gaiano, M., Melani, M., & Montell, D. J. (2007). A protocol for culturing *Drosophila melanogaster* stage 9 egg chambers for live imaging. *Nature protocols*, 2(10), 2467-2473.
- Proikas-Cezanne, T., Gaugel, A., Frickey, T., & Nordheim, A. (2006). Rab14 is part of the early endosomal clathrin-coated TGN microdomain. *FEBS Letters*, 580(22), 5241-5246.
- Rad, M., Phan, H., Kirchrath, L., Tan, P., Kirchhausen, T., Hollenberg, C., et al. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* Apl2p, a homologue of the mammalian clathrin AP1 beta subunit, plays a role in clathrin-dependent Golgi functions. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 108, 1605-1615.
- Radhakrishnan, K., Baltes, J., Creemers, J. W., & Schu, P. (2013). Trans-Golgi network morphology and sorting is regulated by prolyl-oligopeptidase-like protein PREPL and the AP-1 complex subunit  $\beta$ 1A. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 126(5), 1155-1163.
- Ramachandran, R. (2011). Vesicle scission: Dynamin. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(1), 10-17.
- Raymond, F. L., Thompson, D., West, S., Easton, D. F., Wooster, R., Futreal, P. A., et al. (2006). Mutations in the Gene Encoding the Sigma 2 Subunit of the Adaptor Protein 1 Complex, AP1S2, Cause X-Linked Mental Retardation. *The American Journal of Human Genetics*, 79(6), 1119-1124.
- Ren, X., Farías, G., Canagarajah, B., Bonifacino, J., & Hurley, J. (2013). Structural Basis for Recruitment and Activation of the AP-1 Clathrin Adaptor Complex by Arf1. *Cell*, 152(4), 755-767.
- Robinson, D., Cant, K., & Cooley, L. (1994). Morphogenesis of *Drosophila* ovarian ring canals. *Development*, 120(7), 2015-25..
- Robinson, D., Smith-Leiker, T., Sokol, N., Hudson, A., & Cooley, L. (1997). Formation of the *Drosophila* ovarian ring canal inner rim depends on cheerio. *Genetics*, 145(4), 1063-72.
- Robinson, M. S. (1987). 100-kD coated vesicle proteins: molecular heterogeneity and intracellular distribution studied with monoclonal antibodies. *The Journal of Cell Biology*, 104(4), 887-895.
- Robinson, M. S., Sahlender, D. A., & Foster, S. D. (2010). Rapid Inactivation of Proteins by Rapamycin-Induced Rerouting to Mitochondria. *Developmental Cell*, 18(2), 324-331.
- Robinson, M. S., Sahlender, D. A., & Foster, S. D. (2010). Rapid Inactivation of Proteins by Rapamycin-Induced Rerouting to Mitochondria. *Developmental Cell*, 18(2), 324-331.
- Rodriguez-Boulán, E., Perez-Bay, A., Schreiner, R., & Gravotta, D. (2013). Response: The  $\beta$  of the Twin Adaptors. *Developmental Cell*, 27(3), 247-248.
- Roeth, J., Williams, M., Kasper, M., Filzen, T., & Collins, K. (2004). HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. *The Journal of Cell Biology*, 167(5), 903-913.
- Roeth, J. F., Sawyer, J. K., Wilner, D. A., Peifer, M., & Bergmann, A. (2009). Rab11 Helps Maintain Apical Crumbs and Adherens Junctions in the *Drosophila* Embryonic Ectoderm. *PLoS ONE*, 4(10), e7634.
- Roth, T. F. (1964). Yolk Protein Uptake In The Oocyte Of The Mosquito *Aedes Aegypti*. *The Journal of Cell Biology*, 20(2), 313-332.
- Sakaguchi-Nakashima, A., Meir, J. Y., Jin, Y., Matsumoto, K., & Hisamoto, N. (2007). LRK-1, a *C. elegans* PARK8-Related Kinase, Regulates Axonal-Dendritic Polarity of SV Proteins. *Current Biology*, 17(7), 592-598.

- Schluter, M. A., Pfarr, C. S., Pieczynski, J., Whiteman, E. L., Hurd, T. W., Fan, S., et al. (2009). Trafficking of Crumbs3 during Cytokinesis Is Crucial for Lumen Formation. *Molecular Biology of the Cell*, 20(22), 4652-4663.
- Schmidt, M. R., Dotti, C. G., Oschkinat, H., Strauss, H., Barak, N. N., Doglio, L., et al. (2009). Regulation of endosomal membrane traffic by a Gadin/AP-1/kinesin KIF5 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), 15344-15349.
- Seaman, M. N. (2007). Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-mediated endosome-to-TGN retrieval. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 120(14), 2378-2389.
- Shafaq-Zadah, M., Brocard, L., Solari, F., & Michaux, G. (2012). AP-1 is required for the maintenance of apico-basal polarity in the *C. elegans* intestine. *Development*, 139(11), 2061-2070.
- Shaye, D. D., Casanova, J., & Llimargas, M. (2008). Modulation of intracellular trafficking regulates cell intercalation in the *Drosophila* trachea. *Nature Cell Biology*, 10(8), 964-970.
- Shiba, Y., Takatsu, H., Shin, H., & Nakayama, K. (2002).  $\gamma$ -Adaptin Interacts Directly with Rabaptin-5 through Its Ear Domain1. *Journal of Biochemistry*, 131(3), 327-336.
- Shim, J., Sternberg, P. W., & Lee, J. (2000). Distinct and Redundant Functions of  $\beta$ 1 Medium Chains of the AP-1 Clathrin-Associated Protein Complex in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell*, 11(8), 2743-2756.
- Simmen, T., HÄfning, S., Icking, A., Tikkanen, R., & Hunziker, W. (2002). AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nature Cell Biology*, 4(2), 154-159.
- Simons, K., & Meer, G. V. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27(17), 6197-6202.
- Simske, J. (2013). Claudins reign: The claudin/EMP/PMP22/ $\beta$ 3 channel protein family in *C. elegans*. *Tissue Barriers*, 1(3), e25502.
- Singh, R. K., Lau, D., Noviello, C. M., Ghosh, P., Guatelli, J. C., & Sommer, P. (2009). An MHC-I Cytoplasmic Domain/HIV-1 Nef Fusion Protein Binds Directly to the  $\beta$ 4 Subunit of the AP-1 Endosomal Coat Complex. *PLoS ONE*, 4(12), e8364.
- Soldati, T., & Schliwa, M. (2006). Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(12), 897-908.
- Stamnes, M. A., & Rothman, J. E. (1993). The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell*, 73(5), 999-1005.
- Stepp, J. D., Pellicena-Palle, A., Hamilton, S., Kirchhausen, T., & Lemmon, S. K. (1995). A late Golgi sorting function for *Saccharomyces cerevisiae* Apm1p, but not for Apm2p, a second yeast clathrin AP medium chain-related protein. *Molecular Biology of the Cell*, 6(1), 41-58.
- Straight, A., Field, C., & Mitchison, T. (2004). Anillin Binds Nonmuscle Myosin II and Regulates the Contractile Ring. *Molecular Biology of the Cell*, 16(1), 193-201.
- Sugimoto, H., Sugahara, M., Mellman, I., Ohno, H., Fölsch, H., Koide, Y., et al. (2002). Differential Recognition of Tyrosine-based Basolateral Signals by AP-1B Subunit micro1B in Polarized Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(7), 2374-2382.
- Surma, M. A., Klose, C., Klemm, R. W., Ejsing, C. S., & Simons, K. (2011). Generic Sorting of Raft Lipids into Secretory Vesicles in Yeast. *Traffic*, 12(9), 1139-1147.
- Suzuki, A., Ohnishi, T., Izumi, Y., Akimoto, K., Shimizu, M., Mizuno, K., et al. (2001). Atypical Protein Kinase C Is Involved in the Evolutionarily Conserved Par Protein Complex and Plays a Critical Role in Establishing Epithelia-Specific Junctional Structures. *The Journal of Cell Biology*, 152(6), 1183-1196.
- Tai, C., Mysore, S. P., Chiu, C., & Schuman, E. M. (2007). Activity-Regulated N-Cadherin Endocytosis. *Neuron*, 54(5), 771-785.
- Takahashi, D., Waguri, S., Date, Y., Sato, T., Mandai, Y., Ohmae, M., et al. (2011). The Epithelia-Specific Membrane Trafficking Factor AP-1B Controls Gut Immune Homeostasis in Mice. *Gastroenterology*, 141(2), 621-632.
- Tamada, M., Farrell, D., & Zallen, J. (2012). Abl Regulates Planar Polarized Junctional Dynamics through  $\beta$ -Catenin Tyrosine Phosphorylation. *Developmental Cell*, 22(2), 309-319.
- Tan, J., Oh, K., Burgess, J., Hipfner, D., & Brill, J. (2014). PI4KIII $\beta$  is required for cortical integrity and cell polarity during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Sci.*, 127(5), 954-966.
- Tanentzapf, G., & Tepass, U. (2002). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nature Cell Biology*, 5(1), 46-52.
- Tazeh, N. N., Silverman, J. S., Schwartz, K. J., Sevova, E. S., Sutterwala, S. S., & Bangs, J. D. (2009). Role of AP-1 in Developmentally Regulated Lysosomal Trafficking in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, 8(9), 1352-1361.
- Teh, O., Shimono, Y., Shirakawa, M., Fukao, Y., Tamura, K., Shimada, T., et al. (2013). The AP-1  $\gamma$  Adaptin Is Required for KNOLLE Localization at the Cell Plate to Mediate Cytokinesis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 54(6), 838-847.
- Tepass, U., Theres, C., & Knust, E. (1990). crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell*, 61(5), 787-799.

- Tepass, U., & Knust, E. (1993). crumbs and stardust Act in a Genetic Pathway That Controls the Organization of Epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 159(1), 311-326.
- Tepass, U. (1996). Crumbs, a Component of the Apical Membrane, Is Required for Zonula Adherens Formation in Primary Epithelia of *Drosophila*. *Developmental Biology*, 177(1), 217-225.
- Theo, A., Tenza, D., Bonifacino, J., Marks, M., Raposo, G., Martina, J., et al. (2005). Functions of Adaptor Protein (AP)-3 and AP-1 in Tyrosinase Sorting from Endosomes to Melanosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 16(11), 5356-5372.
- Thompson, A., Nessler, R., Wisco, D., Anderson, E., Winckler, B., & Sheff, D. (2007). Recycling Endosomes of Polarized Epithelial Cells Actively Sort Apical and Basolateral Cargos into Separate Subdomains. *Molecular Biology of the Cell*, 18(7), 2687-2697.
- Thompson, B. J., Mathieu, J., Sung, H., Loeser, E., R  rth, P., & Cohen, S. M. (2005). Tumor Suppressor Properties of the ESCRT-II Complex Component Vps25 in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 9(5), 711-720.
- Tilney, L., Tilney, M., & Guild, G. (1996). Formation of actin filament bundles in the ring canals of developing *Drosophila* follicles. *The Journal of Cell Biology*, 133(1), 61-74.
- Toettcher, J. E., Voigt, C. A., Weiner, O. D., & Lim, W. A. (2010). The promise of optogenetics in cell biology: interrogating molecular circuits in space and time. *Nature Methods*, 8(1), 35-38.
- Torres, I., Rosa-Ferreira, C., & Munro, S. (2014). The Arf family G protein Arl1 is required for secretory granule biogenesis in *Drosophila*. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 127, 2151-2160.
- Traub, L. M. (1993). Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes. *The Journal of Cell Biology*, 123(3), 561-573.
- Truong   Quang, B., Mani, M., Markova, O., Lecuit, T., & Lenne, P. (2013). Principles of E-Cadherin Supramolecular Organization In   Vivo. *Current Biology*, 23(22), 2197-2207.
- Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S. E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., et al. (1995). Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature*, 378(6557), 632-635.
- Vaccari, T., Rusten, T. E., Menut, L., Nezis, I. P., Brech, A., Stenmark, H., et al. (2009). Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by efficient isolation of ESCRT mutants. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 122(14), 2413-2423.
- Valdivia, R. H., Baggott, D., Chuang, J. S., & Schekman, R. W. (2002). The Yeast Clathrin Adaptor Protein Complex 1 Is Required for the Efficient Retention of a Subset of Late Golgi Membrane Proteins. *Developmental Cell*, 2(3), 283-294.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M., & Fuchs, E. (2000). Directed Actin Polymerization Is the Driving Force for Epithelial Cell  Cell Adhesion. *Cell*, 100(2), 209-219.
- Vieira, O. V., Gaus, K., Verkade, P., Fullekrug, J., Vaz, W. L., & Simons, K. (2006). From the Cover: FAPP2, cilium formation, and compartmentalization of the apical membrane in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49), 18556-18561.
- Vijayasradhi, S., Xu, Y., Bouchard, B., & Houghton, A. (1995). Intracellular sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: identification of signals for sorting of the human brown locus protein, gp75. *The Journal of Cell Biology*, 130(4), 807-820.
- Vreede, G. d., Schoenfeld, J., Windler, S., Morrison, H., Lu, H., & Bilder, D. (2014). The Scribble module regulates retromer-dependent endocytic trafficking during epithelial polarization. *Development*, 141(14), 796-802.
- Wakabayashi, Y., Dutt, P., Lippincott-Schwartz, J., & Arias, I. (2005). Rab11a and myosin Vb are required for bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(42), 15087-15092.
- Wang, Y. J., Roth, M. G., Albanesi, J. P., Kirchhausen, T., Macia, E., Sun, Y. X., et al. (2003). Phosphatidylinositol 4 Phosphate Regulates Targeting of Clathrin Adaptor AP-1 Complexes to the Golgi. *Cell*, 114(3), 299-310.
- Warn, R., Gutzeit, H., Smith, L., & Warn, A. (1985). F-actin rings are associated with the ring canals of the *Drosophila* egg chamber. *Experimental Cell Research*, 157(2), 355-363.
- Windler, S. L., & Bilder, D. (2010). Endocytic Internalization Routes Required for Delta/Notch Signaling. *Current Biology*, 20(6), 538-543.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M., & Knust, E. (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *drosophila*. *Cell*, 82(1), 67-76.
- Wonderlich, E. R., Leonard, J. A., Kulpa, D. A., Leopold, K. E., Norman, J. M., & Collins, K. L. (2011). ADP Ribosylation Factor 1 Activity Is Required To Recruit AP-1 to the Major Histocompatibility Complex Class I (MHC-I) Cytoplasmic Tail and Disrupt MHC-I Trafficking in HIV-1-Infected Primary T Cells. *Journal of Virology*, 85(23), 12216-12226.
- Xiao, K., Garner, J., Buckley, K., Vincent, P., Chiasson, C., Dejana, E., et al. (2005). p120-Catenin Regulates Clathrin-dependent Endocytosis of VE-Cadherin. *Molecular Biology of the Cell*, 16(11), 5141-5151.

- Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I., & Nelson, W. J. (2005). Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex. *Cell*, 123(5), 889-901.
- Yamamoto, S., Bayat, V., Bellen, H. J., Tan, C., & Singh, S. R. (2013). Protein Phosphatase 1 Limits Ring Canal Constriction during *Drosophila* Germline Cyst Formation. *PLoS ONE*, 8(7), e70502.
- Yeaman, C., Grindstaff, K., & Nelson, W. (2004). Mechanism of recruiting Sec6/8 (exocyst) complex to the apical junctional complex during polarization of epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 117(4), 559-570.
- Yeung, B. G., Phan, H. L., & Payne, G. S. (1999). Adaptor Complex-independent Clathrin Function in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 10(11), 3643-3659.
- Yoshida, C., & Takeichi, M. (1982). Teratocarcinoma cell adhesion: Identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell*, 28(2), 217-224.
- Yu, Y., Sugiura, R., Umeda, N., Hagihara, K., Park, K., Shintani, M., et al. (2012). Sip1, a Conserved AP-1 Accessory Protein, Is Important for Golgi/Endosome Trafficking in Fission Yeast. *PLoS ONE*, 7(9), e45324.
- Yu, Y., Sugiura, R., Umeda, N., Hagihara, K., Park, K., Shintani, M., et al. (2012). Sip1, a Conserved AP-1 Accessory Protein, Is Important for Golgi/Endosome Trafficking in Fission Yeast. *PLoS ONE*, 7(9), e45324.
- Zhang, H., Kim, A., Abraham, N., Khan, L. A., Hall, D. H., Fleming, J. T., et al. (2012). Clathrin and AP-1 regulate apical polarity and lumen formation during *C. elegans* tubulogenesis. *Development*, 139(11), 2071-2083.
- Zhang, X., Ellis, S., Sriratanana, A., Mitchell, C., & Rowe, T. (2004). Sec15 Is an Effector for the Rab11 GTPase in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 43027-43034.
- Zhou, B., Wu, Y., & Lin, X. (2011). Retromer regulates apical-basal polarity through recycling crumbs. *Developmental Biology*, 360(1), 87-95.
- Zizioli, D., Meyer, C., Guhde, G., Saftig, P., Figura, K. v., & Schu, P. (1999). Early Embryonic Death of Mice Deficient in gamma-Adaptin. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5385-5390.
- Zizioli, D., Cotelli, F., Preti, A., Borsani, G., Bresciani, R., Fanzani, A., et al. (2010). Characterization of the AP-1 m1A and m1B adaptins in zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Dynamics*, 239(9), 2404-2412.